

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
19. September 2002 (19.09.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/072848 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/82,
15/54, 9/10

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02492

(22) Internationales Anmeldedatum:
7. März 2002 (07.03.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
101 11 676.4 9. März 2001 (09.03.2001) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): SUNGENE GMBH & CO. KGAA [DE/DE]; 06468
Gatersleben (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BADUR, Ralf
[DE/DE]; Teodor-Storm-Str. B, 67117 Limburgerhof
(DE). GEIGER, Michael [DE/DE]; Neuer Weg 15, 06484
Quedlinburg (DE).

(74) Anwalt: DOERPER, Thomas; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

WO 02/072848 A2

(54) Title: INCREASE IN THE VITAMIN E CONTENT IN ORGANISMS DUE TO AN INCREASE IN THE TYROSINE AMINOTRANSFERASE ACTIVITY

(54) Bezeichnung: ERHÖHUNG DES VITAMIN-E-GEHALTS IN ORGANISMEN DURCH ERHÖHUNG DER TYROSINAMINOTRANSFERASE-AKTIVITÄT

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing vitamin E by cultivating organisms, especially plants, which have an increased tyrosine aminotransferase activity in relation to the wild type. The invention also relates to the genetically modified organisms, especially plants themselves.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen, insbesondere Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen, sowie die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Pflanzen selbst.

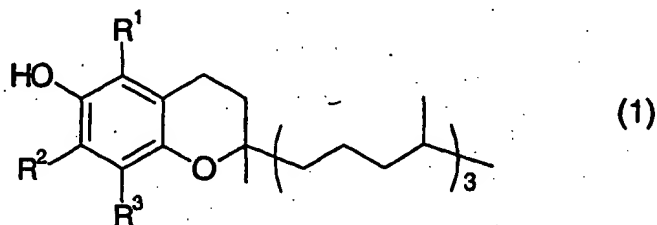
Erhöhung des Vitamin-E-Gehalts in Organismen durch Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität

5 Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen, insbesondere Pflanzen die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Tyrosinamino-
 10 transferase-Aktivität aufweisen, sowie die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Pflanzen selbst.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia
 15 of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die Gruppe der Tocopherole (1a-d) weist eine gesättigte Seitenkette auf, die Gruppe der Tocotrienole (2a-d) eine ungesättigte Seitenkette:

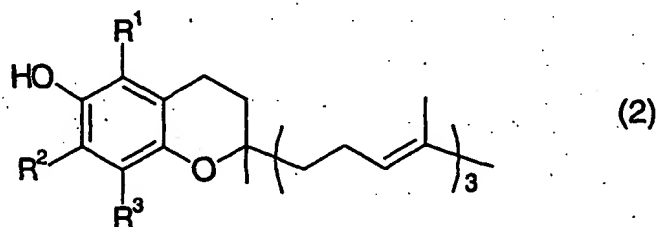
20



25

- 1a, α -Tocopherol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 1b, β -Tocopherol: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$
 1c, γ -Tocopherol: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 30 1d, δ -Tocopherol: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$.

35



- 2a, α -Tocotrienol: $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 40 2b, β -Tocotrienol: $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$, $R^2 = \text{H}$
 2c, γ -Tocotrienol: $R^1 = \text{H}$, $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$
 2d, δ -Tocotrienol: $R^1 = R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$

In der vorliegenden Erfindung werden unter Vitamin E alle vor-
 45 stehend erwähnten Tocopherole und Tocotrienole mit Vitamin-E-Aktivität verstanden.

Diese Verbindungen mit Vitamin-E-Aktivität sind wichtige natürliche fett-lösliche Antioxidantien. Ein Mangel an Vitamin E führt bei Menschen und Tieren zu pathophysiologischen Situationen. Vitamin E-Verbindungen haben daher einen hohen wirtschaftlichen Wert als Zusatzstoffe im Food- und Feed-Bereich, in pharmazeutischen Formulierungen und in kosmetischen Anwendungen.

Ein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von Vitamin E-Verbindungen sowie Nahrungs- und Futtermittel mit erhöhtem Vitamin E-Gehalt sind daher von großer Bedeutung.

Besonders wirtschaftliche Verfahren sind biotechnologische Verfahren unter Ausnutzung natürlicher oder durch genetische Veränderung optimierter Vitamin-E-produzierender Organismen.

Abbildung 62 zeigt ein Biosyntheschema von α -Tocopherol in höheren Pflanzen.

In höheren Pflanzen wird Tyrosin ausgehend von Chorismat über Prephenat und Arogenat gebildet. Die aromatische Aminosäure Tyrosin wird durch das Enzym Tyrosinaminotransferase in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird.

Die Homogentisinsäure wird anschließend an Phytylpyrophosphat (PPP) bzw. Geranylgeranylpyrophosphat gebunden, um die Vorläufer von α -Tocopherol und α -Tocotrienol, das 2-Methyl-6-phytylhydrochinol bzw. das 2-Methyl-6-geranylgeranylhydrochinol zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methylgruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung γ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung α -Tocopherol.

Es sind Versuche bekannt, in transgenen Organismen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene eine Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol- bzw. Tocotrienolgehaltes zu erreichen.

WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatioxygenase (HPPD).

WO 99/04622 bzw. D. DellaPenna et al., Science 1998, 282, 2098-2100 beschreiben Gensequenzen codierend für eine γ -Tocopherolmethyltransferase aus Synechocystis PCC6803 und Arabidopsis thaliana und deren Einbau in transgene Pflanzen, die einen modifizierten Vitamin E-Gehalt aufweisen.

WO 99/23231 zeigt, daß die Expression einer Geranylgeranyl-Reductase in transgenen Pflanzen eine gesteigerte Tocopherolbiosynthese zur Folge hat.

5 WO 00/08169 beschreibt Gensequenzen codierend eine 1-Deoxy-D-Xylose-5-Phosphat-Synthase und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase und deren Einbau in transgene Pflanzen, die einen modifizierten Vitamin E-Gehalt aufweisen.

10 WO 00/68393 und WO 00/63391 beschreiben Gensequenzen codierend eine Phytyl/Prenyl-Transferase und deren Einbau in transgene Pflanzen, die einen modifizierten Vitamin E-Gehalt aufweisen.

In WO 00/61771 wird postuliert, daß die Kombination eines Gens
15 aus dem Sterol-Stoffwechsel in Kombination mit einem Gen aus dem Tocopherolstoffwechsel zu einer Erhöhung des Tocopherolgehalts in transgenen Pflanzen führen kann.

In einer von A. Lopoukhina verfassten Doktorarbeit (*Characteri-*
20 *zation of coronatine regulated genes from Arabidopsis thaliana*, Doktorarbeit an der Ruhr-Universität Bochum, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, 1999) und in einem Posterbeitrag von H. Holländer-Czytko et al. auf der Botanikertagung 2000 in Jena vom 17-22.9.2000 werden durch das Phytotoxin Coronatin induzier-
25 bare Gene aus *Arabidopsis thaliana* offenbart. Bei einem dieser Gene weist die abgeleitete Aminosäuresequenz eine Homologie von ca. 35 % mit bekannten Tyrosinaminotransferasen auf. Durch heterologe Expression des putativen Tyrosinaminotransferase-Gens in *E.coli* konnte eine geringe Enzymaktivität einer Tyrosinamino-
30 transferase nachgewiesen werden. Es wird offenbart, daß die Behandlung von Pflanzen mit Coronatin und die Verwundung von Pflanzen zu einer Akkumulation der putativen Tyrosinaminotransferase-spezifischen mRNA, der putativen Tyrosinaminotransferase und der meßbaren Enzymaktivität führt. Ferner wird
35 auf Seite 72 f. der Doktorarbeit offenbart, daß es bekannt sei, daß die Verwundung von Pflanzen zu einer Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt, die durch antioxidative Verbindungen wie Tocopherol, Carotinoide oder Rosmarinsäure abgefangen werden.

40 Alle diese Methoden, bis auf den zuletzt erwähnten Stand der Technik, liefern zwar genetisch veränderte Organismen, insbesondere Pflanzen, die in der Regel einen modifizierten Gehalt an Vitamin E aufweisen, weisen jedoch den Nachteil auf, daß die Höhe des Gehalts an Vitamin E in den im Stand der Technik
45 bekannten genetisch veränderten Organismen noch nicht zufriedenstellend ist.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde ein weiteres Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen zur Verfügung zu stellen, bzw. weitere transgene Organismen, die Vitamin E herstellen, zur Verfügung zu stellen, 5 die optimierte Eigenschaften, wie beispielsweise einen höheren Gehalt an Vitamin E aufweisen und den geschilderten Nachteil des Standes der Technik nicht aufweisen.

Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von Vitamin E gefunden, indem man Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wild- 10 typ eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen.

Unter Tyrosinaminotransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Tyrosinaminotransferase verstanden.

15

Unter einer Tyrosinaminotransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Tyrosin in 4-Hydroxyphenylpyruvat umzuwandeln.

20 Dementsprechend wird unter Tyrosinaminotransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tyrosinaminotransferase umgesetzte Menge Tyrosin bzw. gebildete Menge 4-Hydroxyphenylpyruvat verstanden.

25 Bei einer erhöhten Tyrosinaminotransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tyrosinaminotransferase die umgesetzte Menge Tyrosin bzw. die gebildete Menge 4-Hydroxyphenylpyruvat erhöht.

30

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %; bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter 35 mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Tyrosinaminotransferase-Aktivität des Wildtyps.

Unter einem Wildtyp wird der entsprechende nicht genetisch veränderte Ausgangsorganismus verstanden. Vorzugsweise und insbesondere 40 in Fällen in denen der Organismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zuordenbar ist, wird unter Wildtyp für die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Homogentisat-Phenyltransferase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, die Erhöhung 45 der nachstehend beschriebenen 2-Me-

5

thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen Tocopherolcyclase-Aktivität, die Erhöhung der nachstehend beschriebenen γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität, die Reduzierung der nachstehend beschriebenen Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, die Reduzierung der nachstehend beschriebenen Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität und die Reduzierung der nachstehend beschriebenen Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität, sowie für die Erhöhung des Gehalts an Vitamin E ein Referenzorganismus verstanden. Dieser Referenzorganismus ist vorzugsweise *Brassica napus cv Westar*.

Die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Translations- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase gegenüber dem Wildtyp, beispielsweise durch Induzierung des Tyrosinaminotransferase-Gens durch Phytotoxine wie beispielsweise Coronatin oder durch Einbringen von Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase.

Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus, insbesondere Pflanzen eigenen endogenen Tyrosinaminotransferasen verstanden. Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Tyrosinaminotransferasen kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine veränderte oder vorzugsweise erhöhte Expressionsrate mindestens eines endogenen Tyrosinaminotransferase Gens zur Folge hat, kann durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression mindestens einer endogenen Tyrosinaminotransferase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdschubstanzen erfolgen.

Des weiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression mindestens eines endogenen Tyrosinaminotransferase Gens dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulatorprotein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase.

5

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase durch Einbringen von Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase in den Organismus.

10

Dazu kann prinzipiell jedes Tyrosinaminotransferase-Gen, also jede Nukleinsäuren die eine Tyrosinaminotransferase codiert verwendet werden. Bei genomischen Tyrosinaminotransferase-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Tyrosinaminotransferase zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20

Alle in der Beschreibung erwähnten Nukleinsäuren können beispielsweise eine RNA-, DNA- oder cDNA-Sequenz sein.

Beispiele für Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase bzw. Beispiele für Tyrosinaminotransferasen sind

25

die sechs putativen Tyrosinaminotransferasen TAT I bis TAT VI aus *Arabidopsis thaliana* TATI: CAA23026 (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 5, Protein: SEQ. ID. NO. 6), TAT II: CAA23025, TAT III: AAD23027 (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 7, Protein: SEQ. ID. NO. 8), TAT IV: CAA16881, TAT V: AAD21706 (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 9, Protein: SEQ. ID. NO. 10), TAT VI: (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 11, Protein: SEQ. ID. NO. 12)

35

die Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 1, Protein: SEQ. ID. NO. 2),
eine Variante der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Nukleinsäure: SEQ. ID. NO. 3, Protein: SEQ. ID. NO. 4),

40

die humane Tyrosinaminotransferase (Accession No. XP_008081),

45

die Tyrosinaminotransferase aus *Tryposoma rangeli* (Accession No. AF165323_1),

die Tyrosinaminotransferase aus *Tryposoma cruzi* (Accession No. AI 622965) oder

die Tyrosinaminotransferase aus *Rhizobium meliloti* (Accession 5 No. L05065).

Bevorzugt verwendet man Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion
10 von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 %, vorzugsweise mindestens 33 %, bevorzugter mindestens 35 %, bevorzugter mindestens 50%, noch bevorzugter mindestens 70 %, am bevorzugtesten mindestens 90 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische
15 Eigenschaft einer Tyrosinaminotransferase aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Aminosäuresequenz der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* dar.

20 Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu verstehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, bei-
25 spielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini
30 des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere
35 Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch Vergleich mit Hilfe der
40 Lasergene Software der Firma DNASTAR, inc. Madison, Wisconsin (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a micro-computer. Comput Appl. Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

45

Multiple alignment parameter:
Gap penalty

10

8

Gap length penalty	10
Pairwise alignment parameter:	
K-tuple	1
Gap penalty	3
5 Window	5
Diagonals saved	5

- Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist,
- 10 wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 20 % aufweist.
- 15 Die bekannten Tyrosinaminotransferasen weisen mit der SEQ. ID. NO. 2 (Tyrosinaminotransferasen aus *Rattus norvegicus*) nach obigem Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz folgende Identität [%] der Aminosäuresequenzen auf:

20 CAA23026 (TAT I)	26,8 %
CAA23025 (TAT II)	22,3 %
AAD23027 (TAT III)	28,3 %
CAA16881 (TAT IV)	29,8 %
AAD21706 (TAT V)	30,0 %
25 TAT VI K19.P17.14	33,3 %
AF165323_1 (<i>Tryposoma rangeli</i>)	33,3 %
XP_008081 (human)	91,6 %

- In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden Nukleinsäuren
- 30 in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* SEQ. ID. NO. 2 oder die Aminosäuresequenz der humanen Tyrosinaminotransferase (Accession No. XP_008081).

- 35 Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

- Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend
- 40 der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in einer Pflanze exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

- 5 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die cDNA der Tyrosinamino-
10 transferase aus *Rattus norvegicus* (Accession No. NM_012668) dar.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Organismen kultiviert, die gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe
15 Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität und γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität aufweisen.

20 Unter Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase verstanden.

Unter einer Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase wird ein Protein
25 verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Hydroxyphenylpyruvat in Homogentisat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase umgesetzte Menge Hydroxyphenylpyruvat bzw.
30 gebildete Menge Homogentisat verstanden.

Bei einer erhöhten Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer
35 bestimmten Zeit durch das Protein Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase die umgesetzte Menge Hydroxyphenylpyruvat bzw. die gebildete Menge Homogentisat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens
40 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität des Wildtyps.

Unter Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Homogentisat-Phytyltransferase verstanden.

Unter einer Homogentisat-Phytyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Homogentisat und Phytilypyrophosphat in 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Phytyltransferase umgesetzte Menge Homogentisat oder Phytilypyrophosphat bzw. gebildete Menge 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol verstanden.

Bei einer erhöhten Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Phytyltransferase die umgesetzte Menge Homogentisat oder Phytilypyrophosphat bzw. die gebildete Menge 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität des Wildtyps.

Unter Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase verstanden.

Unter einer Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat in Phytilypyrophosphat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat bzw. gebildete Menge Phytilypyrophosphat verstanden.

Bei einer erhöhten Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase die umgesetzte Menge Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat bzw. die gebildete Menge Phytilypyrophosphat erhöht.

11

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch 5 bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität des Wildtyps.

Unter 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität 10 wird die Enzymaktivität einer 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase verstanden.

Unter einer 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, 15 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol in 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität die in einer 20 bestimmten Zeit durch das Protein 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase umgesetzte Menge 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol bzw. gebildete Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol verstanden.

Bei einer erhöhten 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase die umgesetzte Menge 25 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol bzw. die gebildete Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität mindestens 35 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität des Wildtyps.

40 Unter Tocopherolcyclase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Tocopherolcyclase verstanden.

Unter einer Tocopherolcyclase wird ein Protein verstanden, das 45 die enzymatische Aktivität aufweist, 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol in γ -Tocopherol umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Tocopherolcyclase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tocopherolcyclase umgesetzte Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol bzw. gebildete Menge γ -Tocopherol verstanden.

5

Bei einer erhöhten Tocopherolcyclase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Tocopherolcyclase die umgesetzte Menge 2,3-Dimethyl-6-Phytylhydrochinol bzw. die gebildete Menge γ -Tocopherol erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Tocopherolcyclase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Tocopherolcyclase-Aktivität des Wildtyps.

Unter γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer γ -Tocopherol-Methyltransferase verstanden.

Unter einer γ -Tocopherol-Methyltransferase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, γ -Tocopherol in α -Tocopherol umzuwandeln.

25

Dementsprechend wird unter γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein γ -Tocopherol-Methyltransferase umgesetzte Menge γ -Tocopherol bzw. gebildete Menge α -Tocopherol verstanden.

30

Bei einer erhöhten γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein γ -Tocopherol-Methyltransferase die umgesetzte Menge γ -Tocopherol bzw. die gebildete Menge α -Tocopherol erhöht.

35

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität des Wildtyps.

Die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, 2-Me-

45

- thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität und γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität kann unabhängig voneinander durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Protein-ebene oder durch Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, also der Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase gegenüber dem Wildtyp.
- mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase
- Die Erhöhung der Genexpression der entsprechenden Nukleinsäure gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung der entsprechenden Gene durch Aktivatoren, also durch Induzierung des Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gens, Homogentisat-Phytyltransferase-Gens, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Gens, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Gens, Tocopherolcyclase-Gens oder γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gens durch Aktivatoren oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien der entsprechenden Nukleinsäuren, also durch Einbringen mindestens einer der Nukleinsäuren, ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase in den Organismus.

- Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Homogentisat-Phytyltransferase, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Tocopherolcyclase

oder γ -Tocopherol-Methyltransferase wird erfindungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Organismus eigenen, insbesondere der Pflanzen eigenen, endogenen Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenasen, Homogentisat-Phytyltransferasen, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktasen, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferasen, Tocopherolcyclasen oder γ -Tocopherol-Methyltransferasen verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Veränderung der Promotor DNA-Sequenz für Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Homogentisat-Phytyltransferase, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Tocopherolcyclase oder γ -Tocopherol-Methyltransferase kodierende Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des entsprechenden Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Homogentisat-Phytyltransferase, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Tocopherolcyclase oder γ -Tocopherol-Methyltransferase durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Desweiteren kann eine veränderte bzw. erhöhte Expression endogener Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-, Homogentisat-Phytyltransferase-, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-, Tocopherolcyclase- oder γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gene dadurch erzielt werden, dass ein im nicht transformierten Organismus nicht vorkommendes Regulator-Protein mit dem Promotor dieser Gene in Wechselwirkung tritt.

Solch ein Regulator kann ein chimäres Protein darstellen, welches aus einer DNA-Bindedomäne und einer Transkriptionsaktivator-Domäne besteht, wie beispielsweise in WO 96/06166 beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, im folgenden auch HPPD genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure codierend eine HPPD in den Organismus.

15

Dazu kann prinzipiell jedes HPPD-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine HPPD codiert, verwendet werden.

Bei genomischen HPPD-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen
5 Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende HPPD zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

10

Beispiele für HPPD-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine HPPD aus *Arabidopsis thaliana* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 13, Protein: Seq. ID. No. 14) oder eine HPPD aus Gerste (WO 99/04021).

15 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres HPPD-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine HPPD oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine HPPD auf.
20

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 14 oder eine von dieser
25 Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14, und die die enzymatische Eigenschaft einer HPPD aufweisen.
30

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 14 stellt die Aminosäuresequenz der HPPD aus *Arabisopsis thaliana* dar.

35 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 14, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz
40 eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für HPPD und HPPD-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder
45 der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 14 leicht auffinden.

Die HPPD aus Gerste weist beispielsweise mit der HPPD aus *Arabidopsis thaliana* (Seq. ID. No. 14) eine Identität von 57,5% auf.

Weitere Beispiele für HPPD und HPPD-Gene lassen sich weiterhin
5 beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 13 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10 In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der HPPD aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ. ID. NO. 14).

15

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

20 Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

25

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

30 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 13 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 13 stellt die genomische DNA aus *A. thaliana*
35 *liana* dar, die die HPPD der Sequenz SEQ ID NO. 14 codiert.

Alle vorstehend erwähnten HPPD-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix
40 herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase
45 und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren

werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Homogentisat-Phenyltransferase, im folgenden auch HPT genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure codierend eine HPT in den Organismus.

- 10 Dazu kann prinzipiell jedes HPT-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine HPT codiert, verwendet werden.

Bei genomischen HPT-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende HPT zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

- 20 Beispiele für HPT-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine HPT aus *Arabidopsis thaliana* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 15, Protein: Seq. ID. No. 16) oder Nukleinsäuren, codierend eine HPT aus *Glycine max*, *Heliantus annuus*, *Nicotiana tabacum*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare* oder *Syn-
25 echocystis sp. PCC6803*.

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres HPT-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform
30 weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine HPT oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine HPT auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter
35 Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 16 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter
40 zugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 16, und die die enzymatische Eigenschaft einer HPT aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 16 stellt die Aminosäuresequenz der HPT
45 aus *Arabidopsis thaliana* dar.

18

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 16 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 16, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für HPT und HPT-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 16 leicht auffinden.

Die HPT aus *Synechocystis* sp. PCC6803 weist beispielsweise mit der HPT aus *Arabidopsis thaliana* (Seq. ID. No. 16) eine Identität von 40,9 % auf.

Weitere Beispiele für HPT und HPT-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 15 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der HPT aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ. ID. NO. 16).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 15 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 15 stellt die genomische DNA aus *A. thaliana* dar, die die HPT der Sequenz SEQ ID NO. 16 codiert.

Alle vorstehend erwähnten HPT-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, im folgenden auch GGPPOR genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine GGPPOR in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes GGPPOR-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine GGPPOR codiert, verwendet werden.

Bei genomischen GGPPOR-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende GGPPOR zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für GGPPOR-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine GGPPOR aus *Nicotiana tabacum* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 17, Protein: Seq. ID. No. 18) oder Nukleinsäuren, codierend eine GGPPOR aus *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max*, *Helianthus annuus*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare* oder *Synechocystis sp. PCC6803*.

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres GGPPOR-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine GGPPOR oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine GGPPOR auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 18 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren
5 abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 18, und die die enzymatische Eigenschaft einer GGPPOR aufweisen.

10

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 18 stellt die Aminosäuresequenz der GGPPOR aus *Nicotania tabacum* dar.

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 %
15 auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 18 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 18, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

20

Weitere Beispiele für GGPPOR und GGPPOR-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 18 leicht auffinden.
25

Die GGPPOR aus *Arabidopsis thaliana* weist beispielsweise mit der GGPPOR aus *Nicotania tabacum* (Seq. ID. No. 18) eine Identität von 80 % auf.

30

Weitere Beispiele für GGPPOR und GGPPOR-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 17 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.
35

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der GGPPOR aus *Nicotania tabacum* (SEQ. ID. NO. 18).
40

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.
45

21

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht 5 ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

10

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 17 in den Organismus ein.

15 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 17 stellt die genomische DNA aus *Nicotiana tabacum* dar, die die GGPPOR der Sequenz SEQ. ID. NO. 18 codiert.

Alle vorstehend erwähnten GGPPOR-Gene sind weiterhin in an sich 20 bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode 25 (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory 30 manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, im folgenden auch MT1 35 genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine MT1 in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes MT1-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine MT1 codiert, verwendet werden.

40

Bei genomischen MT1-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende MT1 zu exprimieren, bevorzugt be- 45 reits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für MT1-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine MT1 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 19, Protein: Seq. ID. No. 20).

- 5 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres MT1-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine MT1 oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine MT1 auf.

- Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 20 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 20, und die die enzymatische Eigenschaft einer MT1 aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 20 stellt die Aminosäuresequenz der MT1 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 dar.

- 25 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 20 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 20, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

- Weitere Beispiele für MT1 und MT1-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 20 leicht auffinden.

- Weitere Beispiele für MT1 und MT1-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 19 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

- In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine ko-

dieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der MT1 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (SEQ. ID. NO. 20).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rück-
5 Übersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden.
10 Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so
15 ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 19 in den Orga-
20 nismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 19 stellt die genomische DNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 dar, die die MT1 der Sequenz SEQ ID NO. 20 codiert.

25 Alle vorstehend erwähnten MT1-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix
30 herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase
35 und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Ge-
40 nexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tocopherolcyclase, im folgenden auch CYC genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäuren codierend eine CYC in den Organismus.

Dazu kann prinzipiell jedes CYC-Gen, also jede Nukleinsäure, die
45 eine CYC codiert, verwendet werden.

Bei genomischen CYC-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende CYC zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

Beispiele für CYC-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine CYC aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 21, Protein: Seq. ID. No. 22) oder Nukleinsäuren, codierend eine CYC aus *Glycine max*, *Heliantus annuus*, *Nicotiana tabacum*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana* oder *Hordeum vulgare*.

15 In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens ein weiteres CYC-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine CYC oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine CYC auf.

Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 22 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vorzugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 22, und die die enzymatische Eigenschaft einer CYC aufweisen.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 22 stellt die Aminosäuresequenz der CYC aus *Synechocystis* sp. PCC6803 dar.

35 Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 22 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 22, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz
40 eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für CYC und CYC-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der
45 entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 22 leicht auffinden.

25

Die CYC aus *Arabidopsis thaliana* weist beispielsweise mit der CYC aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (Seq. ID. No. 22) eine Identität von 29,1 % auf.

5 Weitere Beispiele für CYC und CYC-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 21 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der Tocopherolcyclase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der CYC aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (SEQ. ID. NO.

15 22).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

20

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht

25 ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 21 in den Organismus ein.

35 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 21 stellt die genomische DNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 dar, die die CYC der Sequenz SEQ ID NO. 22 codiert.

Alle vorstehend erwähnten CYC-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode
45 (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase

und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, im folgenden auch γ -TMT genannt, durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure codierend eine γ -TMT in den Organismus.

10 Dazu kann prinzipiell jedes γ -TMT-Gen, also jede Nukleinsäure, die eine γ -TMT codiert, verwendet werden.

Bei genomischen γ -TMT-Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen
15 Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall daß der Wirtsorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechende γ -TMT zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

20 Beispiele für γ -TMT-Gene sind Nukleinsäuren, codierend eine γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* (Nukleinsäure: Seq. ID. No. 23, Protein: Seq. ID. No. 24) oder Nukleinsäuren, codierend eine γ -TMT aus *Glycine max*, *Heliantus annuus*, *Nicotiana tabacum*, *Physcomitrella patens*, *Brassica napus*, *Oryza sativa*, *Hordeum vulgare* oder *Synechocystis* sp. PCC6803.
25

In den erfindungsgemäßen transgenen Organismen liegt also in dieser bevorzugten Ausführungsform gegenüber dem Wildtyp mindestens
30 ein weiteres γ -TMT-Gen vor. In dieser bevorzugten Ausführungsform weist der Organismus dementsprechend mindestens eine exogene Nukleinsäure, codierend eine γ -TMT oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren, codierend eine γ -TMT auf.

35 Bevorzugt verwendet man in vorstehend beschriebener bevorzugter Ausführungsform Nukleinsäuren, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 24 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 30 %, vor-
40 zugsweise mindestens 50%, bevorzugter mindestens 70%, noch bevorzugter mindestens 90%, am bevorzugtesten mindestens 95% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 24, und die die enzymatische Eigenschaft einer γ -TMT aufweisen.

45 Die Sequenz SEQ. ID. NO. 24 stellt die Aminosäuresequenz der γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* dar.

Unter einem Protein, das eine Identität von mindestens 30 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 24 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 24, insbesondere nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 30 % aufweist.

Weitere Beispiele für γ -TMT und γ -TMT-Gene lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen oder der entsprechenden rückübersetzten Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der Seq ID. NO. 24 leicht auffinden.

Die γ -TMT aus *Synechocystis* sp. PCC6803 weist beispielsweise mit der γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* (Seq. ID. No. 24) eine Identität von 26,7 % auf.

Weitere Beispiele für γ -TMT und γ -TMT-Gene lassen sich weiterhin beispielsweise ausgehend von der Sequenz SEQ. ID. No. 23 aus verschiedenen Organismen deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungs- und PCR-Techniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

In einer weiter besonders bevorzugten Ausführungsform werden zur Erhöhung der γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität Nukleinsäuren in Organismen eingebracht, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz der γ -TMT aus *Arabidopsis thaliana* (SEQ. ID. NO. 24).

Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind beispielsweise durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich.

Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der organismusspezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage läßt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der betreffenden Organismen leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in Pflanzen exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform bringt man eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 23 in den Organismus ein.

Die Sequenz SEQ. ID. NO. 23 stellt die genomische DNA aus *A. thaliana* dar, die die γ -TMT der Sequenz SEQ ID NO. 24 codiert.

Alle vorstehend erwähnten γ -TMT-Gene sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoramiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Organismen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität und Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität auf.

Unter einer reduzierten Aktivität wird sowohl die reduzierte als auch das komplette Ausschalten der Aktivität verstanden. Eine Reduzierung einer Aktivität umfasst demnach auch eine mengenmäßige Verringerung des entsprechenden Proteins in dem Organismus bis hin zu einem vollständigen Fehlen des entsprechenden Proteins, beispielsweise zu testen durch eine fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Enzymaktivität oder eine fehlende immunologische Nachweisbarkeit der entsprechenden Proteine.

Unter Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Homogentisat-Dioxygenase verstanden.

Unter einer Homogentisat-Dioxygenase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Homogentisat in Maleylacetoacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Dioxygenase umgesetzte Menge Homogentisat bzw. gebildete Menge Maleylacetoacetat verstanden.

Bei einer reduzierten Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Homogentisat-Dioxygenase die

29

umgesetzte Menge Homogentisat bzw. die gebildete Menge Maleylacetoacetat reduziert.

Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

- 10 Unter Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Maleylacetoacetat-Isomerase verstanden.

Unter einer Maleylacetoacetat-Isomerase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Maleylacetoacetat
15 in Fumarylacetoacetat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Maleylacetoacetat-Isomerase umgesetzte Menge Maleylacetoacetat bzw. gebildete Menge
20 Fumarylacetoacetat verstanden.

Bei einer reduzierten Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Maleylacetoacetat-Isomerase die
25 umgesetzte Menge Maleylacetoacetat bzw. die gebildete Menge Fumarylacetoacetat reduziert.

Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens
30 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %. Besonders bevorzugt ist die Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

Unter Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität wird die Enzymaktivität einer Fumarylacetoacetat-Hydrolase verstanden.
35

Unter einer Fumarylacetoacetat-Hydrolase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Fumarylacetoacetat in Fumarat umzuwandeln.
40

Dementsprechend wird unter Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Fumarylacetoacetat-Hydrolase umgesetzte Menge Fumarylacetoacetat bzw. gebildete Menge Fumarat verstanden.
45

Bei einer reduzierten Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Fumarylacetoacetat-Hydrolase die umgesetzte Menge Fumarylacetoacetat bzw. die gebildete Menge 5 Fumarat reduziert.

Vorzugsweise beträgt diese Reduzierung der Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt 100 %.
10 Besonders bevorzugt ist die Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität komplett ausgeschaltet.

Die Homogentisat-Dioxygenase wird im folgenden auch als HGD bezeichnet, die Maleylacetoacetat-Isomerase wird im folgenden auch
15 als MAAI bezeichnet und die Fumarylacetoacetat-Hydrolase wird im folgenden auch als FAAH bezeichnet.

Es zahlreiche Möglichkeiten, um die HGD-, MAAI- und/oder FAAH-Aktivität in gewünschter Weise zu reduzieren.
20

Eine mögliche Methode umfasst die Verwendung mindestens einer Nukleinsäuresequenz, im folgenden auch anti-HGD, anti-MAAI bzw. anti-FAAH genannt, welche zu einer antisense-Nukleinsäuresequenz transkribierbar ist, die zur Inhibition der HGD-, MAAI- und/oder
25 FAAH-Aktivität befähigt ist, beispielsweise indem sie die Expression von endogener HGD, MAAI und/oder FAAH inhibiert.

Diese anti-HGD, anti-MAAI oder anti-FAAH-Nukleinsäuresequenzen können gemäß einer bevorzugten Ausführungsform die in antisense-
30 Orientierung insertierte kodierende Nukleinsäuresequenz der HGD MAAI und/oder FAAH oder funktional äquivalente Fragment der jeweiligen Sequenzen enthalten.

Vorteilhaft kann die antisense-Strategie mit einem Ribozym-Verfahren gekoppelt werden. Ribozyme sind katalytisch aktive RNA
35 Sequenzen, die gekoppelt an die antisense Sequenzen, die Zielsequenzen katalytisch spalten (Tanner NK. FEMS Microbiol Rev. 1999; 23 (3):257-75). Dies kann die Effizienz einer anti-sense Strategie erhöhen.

40 Weitere Methoden zur Reduzierung der HGD-, MAAI- und/oder FAAH-Expression, insbesondere in Pflanzen als Organismen umfassen die zu Kosuppression führende Überexpression homologer HGD-, MAAI- und/oder FAAH-Nukleinsäuresequenzen (Jorgensen et al., Plant Mol.
45 Biol. 1996, 31 (5):957-973) oder die Induktion des spezifischen RNA-Abbaus durch die Pflanze mit Hilfe eines viralen Expressionssystems (Amplikon) (Angell, SM et al., Plant J. 1999,

20(3):357-362). Diese Methoden werden auch als "post-transcriptional gene silencing" (PTGS) bezeichnet.

Weitere Methoden sind die Einführung von Nonsense-Mutationen in
5 das Endogen mittels Einführung von RNA/DNA-Oligonukleotiden in
die Pflanze (Zhu et al., Nat. Biotechnol. 2000, 18(5):555-558)
oder die Generierung von Knockout-Mutanten mit Hilfe von z.B.
T-DNA-Mutagenese (Koncz et al., Plant Mol. Biol. 1992,
20(5):963-976) oder homologer Rekombination (Hohn, B. und Puchta,
10 H, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999, 96:8321-8323.). Ferner ist
eine Genüberexpression oder -repression auch mit spezifischen
DNA-bindenden Faktoren z.B. mit den oben erwähnten Faktoren vom
Typus der Zinkfingertranskriptionsfaktoren. Ferner können Fakto-
ren in eine Zelle eingebracht werden, die das Zielprotein selber
15 inhibieren. Die Protein-bindenden Faktoren können z.B. Aptamere
sein (Famulok M, und Mayer G. Curr Top Microbiol Immunol. 1999;
243:123-36).

Eine weitere Methode zur Reduzierung mindestens einer der vorste-
20 hend beschriebenen Aktivitäten ist die Verwendung von RNA die
einem Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem
Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der
zu reduzierenden Zielsequenz identisch ist. Eine ausführliche Be-
schreibung dieser Methode, die auch RNAi-Technologie genannt
25 wird, ist in WO 99/32619 offenbart.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die zusätzlichen Re-
duzierung mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der
Gruppe HGD-, MAAI- und FAAH-Aktivität durch Reduzierung der Ge-
30 nexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der
Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Dioxygenase,
Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoacetat-Isomerase und Nuk-
leinsäuren kodierend eine Fumarylacetoacetat-Hydrolase gegenüber
dem Wildtyp.

35 Eine Reduzierung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure,
ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Homogenti-
sat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoacetat-
Isomerase und Nukleinsäuren kodierend eine Fumarylacetoacetat-Hy-
40 drolase gegenüber dem Wildtyp kann, wie vorstehend beschrieben,
bevorzugt durch Verwendung folgender Methoden erreicht werden:

- a) Einführung von antisense-Nukleinsäuresequenzen;
- 45 b) Einführung von antisense-Nukleinsäuresequenzen kombiniert mit
einem Ribozym-Verfahren

- c) Einführung von für homologe HGD-, MAAI und/oder FAAH-kodierende und zu Kosuppression führende Nukleinsäuresequenzen
- d) Einführung von HGD-, MAAI und/oder FAAH-Abbau bewirkende virale Nukleinsäuresequenzen und Expressionskonstrukte;
- e) Einführung von Nonsense-Mutanten von endogenen HGD-, MAAI und/oder FAAH kodierenden Nukleinsäuresequenzen;
- 10 f) Einführung von Knockout-Mutanten;
- g) Einführung von zu homologer Rekombination geeigneten Nukleinsäuresequenzen;
- 15 h) Einführung von RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der Organismus eigenen Ziel-Nukleinsäuresequenz identisch ist.
- 20 Auch eine kombinierte Anwendung der vorstehend beschriebenen Methoden ist denkbar.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens weisen die Organismen eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität auf.

Dies wird besonders bevorzugt dadurch erreicht, daß man in den Organismus eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der Organismus eigenen Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase identisch ist. Eine ausführliche Beschreibung dieser Methode, die auch RNAi-Technologie genannt wird, ist in WO 99/32619 offenbart.

35 Je nach verwendetem Organismus ist demnach ein unterschiedliches Teilfragment der Organismus eigenen Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase, zu verwenden.

SEQ. ID. No. 25 stellt beispielsweise ein Teilfragment der HGD-codierenden Nukleinsäure aus *Brassica napus* dar, welches, in ein entsprechendes RNAi-Konstrukt integriert, die HGD-Aktivität in *Brassica napus* reduziert.

In weiteren bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung von Organismen, insbesondere von Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp

5

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

10

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität aufweisen,

15

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

20

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Tocopherolcyclase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität aufweisen,

25

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

30

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine reduzierte Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine reduzierte Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität aufweisen,

35

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität, eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

40

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

45

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- 5 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Tocopherolcyclase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte
10 γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Tocopherolcyclase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydro-

35

chinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte
5 Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und ein Tocopherolcyclase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

10 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität und eine g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

15 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität,
25 und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

30 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine und eine g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine Tocopherolcyclase-Aktivität, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

45 eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

36

phosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

5

- eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität und eine erhöhte Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, und eine Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, und eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, und eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, und eine Tocopherolcy-
- 10 clase-Aktivität, und eine g-Tocopherol-Methyltransferase, und eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen,

Unter Organismen werden erfindungsgemäß prokaryontische

- 15 Organismen oder eukaryontische Organismen, wie beispielsweise Bakterien, Hefen, Algen, Moose, Pilze oder Pflanzen, verstanden, die in der Lage sind, als Wildtyp oder durch genetische Veränderung Vitamin E herzustellen. Bevorzugte Organismen sind photosynthetisch aktive Organismen, wie beispielsweise Cyano-
- 20 bakterien, Moose, Algen oder Pflanzen, die bereits als Wildtyp in der Lage sind, Vitamin E herzustellen.

Besonders bevorzugte Organismen sind Pflanzen.

- 25 Bevorzugte Pflanzen sind Tagetes, Sonnenblume, Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate, Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlarten, Getreide, Alfalfa, Hafer, Gerste, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Baumwolle, Hanf, Brassicaceen wie
- 30 beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Nuß- und Weinspezies oder Holzgewächse wie beispielsweise Espe oder Eibe.

- Besonders bevorzugt sind *Arabidopsis thaliana*, *Tagetes erecta*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, Sonnenblume, Canola, Kartoffel
- 35 oder Soja.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von Vitamin E wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Organismen, im folgenden auch transgene Organismen bezeichnet,

40 ein Ernten der Organismen und ein Isolieren von Vitamin E aus den Organismen angeschlossen.

- Das Ernten der Organismen erfolgt in an sich bekannter Weise dem jeweiligen Organismus entsprechend. Mikroorganismen, wie
- 45 Bakterien, Moose, Hefen und Pilze oder Pflanzenzellen, die durch Fermentation in flüssigen Nährmedien kultiviert werden, können beispielsweise durch Zentrifugieren, Dekantieren oder Filtrieren

abgetrennt werden. Pflanzen werden in an sich bekannter Weise auf Nährböden gezogen und entsprechend geerntet.

Die Isolierung von Vitamin E aus der geernteten Biomasse erfolgt
5 in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Extraktion und gegebenenfalls weiterer chemische oder physikalischer Reinigungsprozesse, wie beispielsweise Fällungsmethoden, Kristallographie, thermische Trennverfahren, wie Rektifizierverfahren oder physikalische Trennverfahren, wie beispielsweise Chromatographie.

10

Die Isolierung von Vitamin E aus Öl-haltigen Pflanzen erfolgt beispielsweise bevorzugt durch chemische Umwandlung und Destillation aus Pflanzenölen oder aus den bei der Desodorierung pflanzlicher Öle anfallenden Wasserdampfdestillate (Dämpfer-
15 kondensate).

Weitere Isolierverfahren von Vitamin E aus Dämpferkondensaten sind beispielsweise in DE 31 26 110 A1, EP 171 009 A2, GB 2 145 079, EP 333 472 A2 und WO 94/05650 beschrieben.

20

Die Herstellung der transgenen Organismen, insbesondere Pflanzen erfolgt vorzugsweise durch Transformation der Ausgangsorganismen, insbesondere Pflanzen, mit einem Nukleinsäurekonstrukt, das die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine
25 Tyrosinaminotransferase enthält, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte zusätzlich eine, zwei oder drei Nukleinsäuren, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Me-
30 thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

40

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthalten die vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte zusätzlich funktionell verknüpft eine RNA, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz
45 aufweist, die mit einem Teil einer Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase identisch ist.

Es ist, insbesondere in Pflanzen, technisch nur schwer zu realisieren, mehr als vier Aktivitäten mit einem Nukleinsäurekonstrukt zu erhöhen oder zu erniedrigen. Daher werden bevorzugt Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten verwendet um die Aktivitäten, 5 insbesondere um mehr als 4 Aktivitäten im Organismus zu erhöhen oder zu erniedrigen.

Es ist jedoch auch möglich, genetisch veränderte Organismen zu kreuzen, die bereits veränderte Aktivitäten enthalten. Beis- 10 pielsweise ist es durch Kreuzen von genetisch veränderten Organismen, die jeweils zwei veränderte Aktivitäten enthalten, möglich, Organismen mit vier veränderten Aktivitäten herzustellen. Gleiches kann auch erreicht werden, indem man eine Kombination von zwei Nukleinsäurekonstrukten die jeweils 2 Aktivitäten verän- 15 dern in den Organismus einführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die bevorzugten genetisch veränderten Organismen durch Einbringen von Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten hergestellt.

20 Dementsprechend betrifft die Erfindung insbesondere eine Kombination aus Nukleinsäurekonstrukten, wobei die Kombination ein Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase, funktionell 25 verknüpft mit einem oder mehreren Regulationssignalen, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, und

a) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt aus der Gruppe A bis F

30 A Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

35 B Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten und

40 C Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten, 45 leisten,

D Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,
5 leisten,

E Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine Tocopherolcyclase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription
10 und Translation in Organismen gewährleisten und

F Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die
15 Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

oder

b) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend
20 zwei, drei oder vier Nukleinsäurekonstrukte, ausgewählt aus der Gruppe der Nukleinsäurekonstrukte A bis F,

umfasst.

25 Diese Nukleinsäurekonstrukte, in denen die kodierenden Nukleinsäuresequenzen mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Pflanzen gewährleisten, werden im folgenden auch Expressionskassetten genannt.

30

Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere als Expressionskassette fungierende Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase, die mit einem oder mehreren
35 Regulationssignalen funktionell verknüpft ist, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Pflanzen gewährleisten.

Vorzugsweise enthalten die Regulationssignale einen oder mehrere
40 Promotoren, die die Transkription und Translation in Organismen, insbesondere in Pflanzen gewährleisten.

Die Expressionskassetten beinhalten Regulationssignale, also regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der
45 kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor

und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für mindestens eines der vorstehend beschriebenen Gene operativ verknüpft sind. Unter
5 einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann.

10 Bei der Verwendung von Pflanzen als Organismus enthalten die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte und Expressionskassetten vorzugsweise eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid, das die Lokalisation in Plastiden gewährleistet.

15 Im folgenden werden beispielhaft die bevorzugten Nukleinsäurekonstrukte, Expressionskassetten und Vektoren für Pflanzen und Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, sowie die transgenen Pflanzen selbst beschrieben.

20 Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER),
25 im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

30 Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor
35 aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989),
40 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des Ziel-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Der-
45 artige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salicylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-indu-

zierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WQ 93/21334) Promotor können beispielsweise verwendet werden.

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen beispielsweise die Biosynthese von Vitamin E bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-245).

Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459-467), LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995), Sucrose-Bindeprotein-Promotor (Zitat), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.

Der Biosyntheseort von Vitamin E ist in Pflanzen unter anderem das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression der erfundungsgemäßen Nukleinsäuren kodierend eine Tyrosinaminotransferase sinnvoll ist. Dies ist jedoch nicht einschränkend, da die Expression auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - besonders in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform betrifft deshalb eine samenspezifische Expression der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression von exogenen Zielgenen von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression der transgen exprimierten Zielgene kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des Ziel-Gens und deren Auswirkung auf die Vitamin E-

Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt vorzugsweise
 5 durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer vorstehend beschriebenen Ziel-Nukleinsäure und vorzugsweise einer zwischen Promotor und Ziel-Nukleinsäure-Sequenz inserierten Nukleinsäure, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations-
 10 und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory,
 15 Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.

Insbesondere bevorzugt sind insertierte Nukleinsäure-Sequenzen,
 20 die ein Targeting in den Plastiden gewährleisten.

Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren Nukleinsäure-Sequenz für ein Ziel-Protein-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die
 25 Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des Ziel-Proteins in die Chloroplasten vom Ziel-Protein-Teil enzymatisch abgespalten werden.

30 Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären *Nicotiana tabacum* Transketolase oder einem anderen Transitpeptid (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase als auch der Isopentenylpyrophosphat Isomerase-2) oder dessen funktionellem
 35 Äquivalent abgeleitet ist.

Besonders bevorzugt sind Nukleinsäure-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Tabak in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente
 40 mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

pTP09

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
 45 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA
 ATCCAATCCCAATATCACCACTCCCGCCGCGTACTCCTTCTCGCCGCGCCGCGCGCTCG

TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGGGA
TCC_BamHI

pTP10

5

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCGTACTCCTTCCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTCG
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGCTG

10 GATCC_BamHI

pTP11

KpnI_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC
15 CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCGTACTCCTTCCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTCG
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTCTGAGACTGCGGGG
ATCC_BamHI

- 20 Ein weiteres Beispiel für ein plastidäres Transitpeptid ist das Transitpeptid der plastidären Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) aus *Arabidopsis thaliana*.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können synthetisch her-
25 gestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen Nukleinsäure-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen.

- 30 Bevorzugt sind, wie vorstehend beschrieben, synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden.

35

Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die
40 Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

- Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Poly-
45 linker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis

6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet vorzugsweise in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine kodierende Nukleinsäuresequenz oder ein Nukleinsäurekonstrukt und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

10

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden.

Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff) oder funktionelle Äquivalente.

30 Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren kodierend ein Tyrosinaminotransferase oder der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder der Tyrosinaminotransferase zur Herstellung von transgenen Organismen, insbesondere Pflanzen.

35

Vorzugsweise weisen diese transgenen Pflanze gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Gehalt an Vitamin E auf.

Daher betrifft die Erfindung ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte zur Erhöhung des Gehalts an Vitamin E in Organismen, die als Wildtyp in der Lage sind, Vitamin E zu produzieren.

45

45

Es ist bekannt, daß Pflanzen mit einem hohen Vitamin-E-Gehalt eine erhöhte Resistenz gegenüber abiotischem Streß aufweisen. Unter abiotischem Streß wird beispielsweise Kälte, Frost, Trockenheit, Hitze und Salz verstanden.

5

Daher betrifft die Erfindung weiterhin die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zur Herstellung transgener Pflanzen, die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Resistenz gegenüber abiotischem Streß aufweisen.

10

Die vorstehend beschriebenen Proteine und Nukleinsäuren können zur Herstellung von Feinchemikalien in transgenen Organismen, vorzugsweise zur Herstellung von Vitamin E in transgenen Pflanzen verwendet werden.

15

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom eines Organismus, insbesondere einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet.

Dazu können insbesondere bei Pflanzen an sich bekannte Methoden

20

zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengewebe oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt werden.

Geeignete Methoden zur Transformation von Pflanzen sind die

25

Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der, vorstehend beschriebene, durch Agrobacterium

30

vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.

35

42 (1991), 205-225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res.

40

12 (1984), 8711).

Dementsprechend betrifft die Erfindung weiterhin Vektoren enthaltend die vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten.

45

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien 5 kultiviert werden.

Die Expressionskassette kann über die Pflanzen hinaus auch zur Transformation von Bakterien, insbesondere Cyanobakterien, Moosen, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen eingesetzt werden.

10

Zur bevorzugten Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen, im folgenden auch transgene Pflanzen bezeichnet, wird die fusionierte Expressionskassette, die eine Tyrosinaminotransferase exprimiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, 15 der geeignet ist, *Agrobacterium tumefaciens* zu transformieren.

Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen verwendet werden, indem beispielsweise ver- 20 wundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in 25 Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die 30 Expressionskassette integriertes Gen für die Expression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine Tyrosinaminotransferase kodierenden Nukleinsäure wird 35 eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" 40 (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 (1993) beschrieben.

Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in ein Derivat des Transformationsvektors pBin-19 mit 35s Promotor (Bevan, M., Nucleic Acids Research 12: 8711-8721 (1984)) ein- 45 gebaut werden.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in *E. coli*, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a.

- 5 pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in *E. coli* als auch in Agrobakterien replizieren können.

Die Erfindung betrifft daher ferner die Verwendung der vorstehend beschriebenen Nukleinsäuren, der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte, insbesondere der Expressionskassetten zur Herstellung von genetisch veränderten Pflanzen oder zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen.

- 15 Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des Gehaltes der Pflanze oder Pflanzenteile an Vitamin E.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen, Blütenblättern oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen.

Dementsprechend betrifft die Erfindung ferner ein Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen indem man eine vorstehend beschriebene Nukleinsäure oder ein vorstehend beschriebenes Nukleinsäurekonstrukt oder eine vorstehend beschriebene Kombination von Nukleinsäurekonstrukten in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.

- 30 Die Erfindung betrifft ferner die vorstehend beschriebenen genetisch veränderten Organismen selbst.

Wie vorstehend erwähnt, weisen die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Pflanzen einen erhöhten Gehalt Vitamin E auf.

Die Erhöhung der Tyrosinamintransferase-Aktivität im Organismus zu einem weiteren Effekt. Es wird nicht nur der Gesamt-Vitamin E-Gehalt erhöht sondern es erfolgt zusätzlich eine selektive Erhöhung der Tocotrienole im Vergleich zu den Tocopherolen.

Als Organismen und zur Herstellung von Organismen mit einem erhöhten Gehalt an Feinchemikalien im Vergleich zum Wildtyp werden in einer bevorzugten Ausführungsform, wie vorstehend erwähnt, photosynthetisch aktive Organismen wie beispielsweise Cyanobakterien, Moose, Algen oder Pflanzen, besonders bevorzugt

Pflanzen als Ausgangsorganismen und dementsprechend auch als genetisch veränderte Organismen verwendet.

Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren
5 Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Bevorzugte Pflanzen sind, wie vorstehend ausgeführt Tagetes, Sonnenblume, Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate,
10 Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlrarten, Getreide, Alfalfa, Hafer, Gerste, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Baumwolle, Hanf, Brassicaceen wie beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr, Nuß- und Weinspezies oder Holzgewächse wie
15 beispielsweise Espe oder Eibe.

Besonders bevorzugt sind *Arabidopsis thaliana*, *Tagetes erecta*, *Brassica napus*, *Nicotiana tabacum*, Sonnenblume, Canola, Kartoffel oder Soja.

20

Die genetisch veränderten Organismen, insbesondere Pflanzen können, können wie vorstehend beschrieben zur Herstellung von Vitamin E verwendet werden.

25 Von Menschen und Tieren verzehrbare erfindungsgemäße, genetisch veränderte Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitamin-E können auch beispielsweise direkt oder nach an sich bekannter Prozessierung als Nahrungsmittel oder Futtermittel oder als Futter- und Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden.

30

Die erfindungsgemäß, genetisch veränderten Pflanzen können ferner zur Herstellung von Vitamin E-haltigen Extrakten verwendet werden.

35 Erhöhung des Gehaltes an Vitamin E bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung vorzugsweise die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze, vorzugsweise für die Dauer mindestens einer Pflanzen-
40 generation.

Unter einem erhöhten Gehalt an Vitamin E wird in der Regel ein erhöhter Gehalt an Gesamt-Tocopherol verstanden. Unter einem erhöhten Gehalt an Vitamin E wird aber auch insbesondere ein
45 veränderter Gehalt der vorstehend beschriebenen 8 Verbindungen mit Tocopherolaktivität verstanden.

Beispielsweise führt das Einbringen eines Tyrosinaminotransferase-Gens in Pflanzen überraschenderweise zu einem besonders erhöhten Anstieg des Gehalts an Tocotrienolen.

- 5 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

Allgemeine Experimentelle Bedingungen:
Sequenzanalyse rekombinanter DNA

10

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463-5467).

15

Beispiel 1

Klonierung des Tyrosinaminotransferase-Gens kodierend die Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus*.

- 20 Die Präparation der RNA aus Rattenleber erfolgte in an sich bekannter Weise wie von S. Kar und B.J. Carr in Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995, 212(1), 21-6 (*Differential display and cloning of messenger RNAs from the late phase of rat liver regeneration*), beschrieben.

25

Die cDNA Synthese wurde unter Verwendung des SuperScript II cDNA Synthese Kit (Gibco BRL) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

- 30 Die Nukleinsäure kodierend eine Tyrosinaminotransferase wurde mittels *polymerase chain reaction* (PCR) aus *Rattus norvegicus* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (Tyrosinaminotransferase 5' SEQ.-ID Nr. 3) und eines antisense spezifischen Primers (Tyrosin-Aminotransferase 3' SEQ.-ID Nr. 4) amplifiziert.

35

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

40

- 2 µl einer *Rattus norvegicus* cDNA (hergestellt wie oben beschrieben)

- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP

45 - 1,5 mM Mg(OAc)₂

- 5 µg Rinderserum-Albumin

- 40 pmol Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer

50

- 40 pmol Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
- 15 µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5 - 5 U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- 10 Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)
- Schritt 6: 4°C (Warteschleife)
- 15 Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/RnTATAsel wurde durch Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) Primers und des
- 20 M13R Primers bestätigt (SEQ. ID. No. 1 und SEQ. ID. NO. 3).

Beispiel 2

- Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 1 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 1 aus *Arabidopsis thaliana*.
- 25

- Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At1Tyrosin-Aminotransferase 5' SEQ. ID. No. 28) und eines antisense spezifischen Primers (At1Tyrosin-Aminotransferase 3' SEQ. ID. No. 29) amplifiziert.
- 30

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 35
- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
 - 5µg Rinderserum-Albumin
 - 40 - 40pmol At1Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer
 - 40pmol At1Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
 - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
 - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

- 45 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

51

- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
30 Wiederholungen der Schritte 2-4
5 Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität
10 des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtTATAse1 wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) Primers und des M13R bestätigt (Seq. ID. No. 5).

Beispiel 3

- 15 Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 3 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana*.

Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana*.
20 unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At3Tyrosin-Aminotransferase 5': SEQ. ID. No. 30) und eines antisense spezifischen Primers (At3Tyrosin-Aminotransferase 3': SEQ. ID. No. 31) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 25 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:
- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
 - 30 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
 - 5µg Rinderserum-Albumin
 - 40pmol At3Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer
 - 40pmol At3Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
 - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
 - 35 - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
40 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)
Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
30 Wiederholungen der Schritte 2-4
Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtTATase3 wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und 5 des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. Nr. 7).

Beispiel 4

Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 5 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana*.

- 10 Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At5Tyrosin-Aminotransferase 5': SEQ. ID. No. 32) und eines antisense spezi-
- 15 fischen Primers (At5Tyrosin-Aminotransferase 3': SEQ. ID. No. 33) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten
- 20 war:

- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 25 - 40pmol At5Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer
- 40pmol At5Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
- 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

- 30 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- 35 Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

- 40 Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtTATase5 wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 9).

Beispiel 5

Klonierung des Tyrosin-Aminotransferase-Gens 6 kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana*.

- 5 Die DNA kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 wird mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At6Tyrosin-Aminotransferase 5': SEQ. ID. No. 34) und eines antisense spezifischen Primers (At6Tyrosin-Aminotransferase 3': SEQ. ID. No. 35) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 15 - 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol At6Tyrosin-Aminotransferase 5'Primer
- 40pmol Ar6Tyrosin-Aminotransferase 3'Primer
- 20 - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wird unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 25 Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

- Das Amplikon wird unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtTATase6 wird durch
- 35 vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. Nr. 11).

Beispiel 6

- 40 Klonierung des Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gens kodierend für die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum*

- Die DNA kodierend für Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase
- 45 -Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Nicotiana tabacum* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 5': SEQ. ID. NO. 36) und

54

eines antisense spezifischen Primers (Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 3': SEQ. ID. No. 37) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 5 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Nicotiana tabacum* cDNA
 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
 - 10 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
 - 5µg Rinder Serum-Albumin
 - 40pmol Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 5' Primer
 - 40pmol Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase 3' Primer
 - 15µl 3,3x rTth- DNA Polymerase Puffer (PE Applied Biosystems)
 - 5U rTth DNA Polymerase (PE Applied Biosystems)
- 15 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)

- 20 Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den

25 PCR Klonierungsvektor pGEMTe (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/NtGGPPOR wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 17).

30

Beispiel 7

Klonierung des Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gens kodierend für die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana*.

35

Die DNA kodierend für das Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 5': SEQ. ID. No. 38) und eines antisense spezifischen Primers (AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase

40 3': SEQ. ID. Nr. 39) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten

45 war:

- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA

55

- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 5'Primer
- 40pmol AtHydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase 3'Primer
- 5 - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 10 Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 15 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)
- Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtHPPD wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des
- 20 M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 13).

Beispiel 8

- 25 Klonierung des Homogentisat-Prenyltransferase-Gens kodierend für die Homogentisat-Prenyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*.

- Die DNA kodierend für das Homogentisinsäure-Prenyltransferase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers
- 30 (AtHomogentisat-Prenyltransferase 5': SEQ. ID. Nr. 40) und eines antisense spezifischen Primers (AtHomogentisat-Prenyltransferase 3': SEQ. ID. No. 41) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 35 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 40 - 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol AtHomogentisinsäure-Prenyltransferase 5'Primer
- 40pmol AtHomogentisinsäure-Prenyltransferase 3'Primer
- 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 45 - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

56

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
 Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)
 Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
 5 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
 Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität
 10 des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/AtHPT wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 15).

Beispiel 9

- 15 Klonierung des 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Gens kodierend für die 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803.
- 20 Die DNA kodierend für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase 5': SEQ. ID. No. 42)
 25 und eines antisense spezifischen Primers (2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase 3': SEQ. ID. No. 43) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 30 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:
- 2µl einer *Synechocystis* sp. PCC6803 DNA
 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
 - 35 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
 - 5µg Rinderserum-Albumin
 - 40pmol 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase 5'Primer
 - 40pmol 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase 3'Primer
 - 40 - 15µl 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
 - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 45 Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
 Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)

57

Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

- 5 Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/SynMT1 wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq ID. No. 19).

10

Beispiel 10

Klonierung des Tocopherolcyclase-Gens (auch 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase-Gen genannt) kodierend für die Tocopherolcyclase (auch 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase genannt) aus *Synechocystis* sp. PCC6803.

15

- Die DNA kodierend für 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase 5': SEQ. ID. No. 44) und eines antisense spezifischen Primers (2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase 3': SEQ.-ID Nr. 45) amplifiziert.

20

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 25 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Synechocystis* sp. PCC6803 DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 30 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase 5'Primer
- 40pmol 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase 3'Primer
- 15µl 10 x Pfu1-Turbo DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U Pfu1-Turbo DNA Polymerase (Stratagene)

35

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

- 40 Schritt 3: 1 Minute 60°C (Annealing)

Schritt 4: 1,5 Minuten 72°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

- 45 Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pCRTopo4blunt (Invitrogen) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pCR4topoblunt/SynCyc

wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-20) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 21).

Beispiel 11

- 5 Klonierung des γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gens kodierend für die γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*.

Die DNA kodierend für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Arabidopsis* 10 *thaliana* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (At γ -Tocopherol-Methyltransferase 5': SEQ. ID. No. 46) und eines antisense spezifischen Primers (At γ -Tocopherol-Methyltransferase 3': SEQ. ID. No. 47) amplifiziert.

- 15 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2 μ l einer *Arabidopsis thaliana* cDNA
- 20 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol At γ -Tocopherol-Methyltransferase 5'Primer
- 40pmol At γ -Tocopherol-Methyltransferase 3'Primer
- 15 μ l 3,3x rTth DNA Polymerase XLPuffer (PE Applied Biosystems)
- 25 - 5U rTth DNA Polymerase XL (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- 30 Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 58°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- 35 Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEM-Te (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/At γ TMT wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des 40 M13R Primers bestätigt (Seq. ID. Nr. 23).

Beispiel 12

- 45 Klonierung eines Teilfragmentes des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens kodierend für die Homogentisinsäure-Dioxygenase aus *Brassica napus*.

Die DNA kodierend für ein Teilfragmentes des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens wurde mittels polymerase chain reaction (PCR) aus *Brassica napus* unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (Homogentisinsäure-Dioxygenase 5': SEQ. ID. No. 48) und eines antisense spezifischen Primers (Homogentisinsäure-Dioxygenase 3': SEQ. ID. No. 49) amplifiziert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 2µl einer *Brassica napus* cDNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol Homogentisinsäure-Dioxygenase 5'Primer
- 40pmol Homogentisinsäure-Dioxygenase 3'Primer
- 15µl 3,3x rTth- DNA Polymerase Puffer (PE Applied Biosystems)
- 5U rTth DNA Polymerase (PE Applied Biosystems)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus-Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 56°C (Annealing)
- Schritt 4: 2 Minuten 72°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das Amplikon wurde unter Verwendung von Standardmethoden in den PCR Klonierungsvektor pGEMTe (Promega) kloniert. Die Identität des erzeugten Amplikons im Vektor pGEMTe/*BnHGD wurde durch vollständige Sequenzierung unter Verwendung des M13F (-40) und des M13R Primers bestätigt (Seq. ID. No. 25).

Beispiel 13

Erzeugung des DNA Konstruktes zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisat-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die eine reduzierte Expression des Homogentisat-Dioxygenase Gens aus *Brassica napus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet. Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des Vicilin Gens aus *Vicia faba* (Weschke W., Bassünér R., van Hai N., Czihal A., Bäumlein H., Wobus U. The structure of a *Vicia faba* Vicilin Gene. Bio-

chem. Physiol. Pflanzen 183, 233-242 (1988)), und das 2. Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. (Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L., Rocha-Sosa M. Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron 5 in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. MGG (1990)), und das Terminationssignal-2 des Octopin-Synthase Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (Gielen et al. 1984) enthält.

- 10 Das DNA Fragment kodierend für das Teilfragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus* wurde als SacI/ScaI Fragment aus dem Plasmid pGEMTe/*BnHGD in den mit SmaI geöffneten pSUN2-Pvic-STLS1-ocsT kloniert, nachdem die überstehenden Enden des Fragmentes mit der T4 Polymerase in glatte Enden überführt wurden. Das resultierende Plasmid pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-ocsT wurde mit ScaI verdaut. In diesen linearisierten Vektor wurde erneut das Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus* als geglättetes SacI/ScaI Fragment aus dem Plasmid pGEMTe/*BnHGD kloniert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die 15 beiden BnHGD-Fragmente in gegenläufiger Orientierung auf beiden Seiten des STLS1 Introns vorhanden sind. Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT (Abbildung 1) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* bzw. *A. thaliana* Pflanzen verwendet.

25

- Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 1 beinhaltet den Promotor des Vicilin Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure Dioxygenase Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2. Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit 30 Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin-Gens.

Beispiel 14

- 35 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *A. thaliana*, *Nicotiana tabacum* bzw. *Brassica napus* Pflanzen, 40 die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (Patent WO 02/00900) verwendet. Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) (Bäumlein H., Boerjan W., 45 Nagy I., Bassüner R., van Montagu M., Inzé D., Wobus U. A novel seed protein gene from *Vicia faba* is developmentally regulated in

transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. MGG 225:459-467 (1991)
, die Sequenz kodierend für das Chloroplasten-Transitpeptid des
Vicia faba Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) Gens (Gueri-
neau F., Woolston S., Brooks L., Mullineaux P. An expression cas-
5 sette for targeting foreign proteins into chloroplasts. Nucleic
Acids Res 16(23): 11380. (1988)) und das Terminationssignal des
Nopalin-Synthase Gens aus *A.tumefaciens* (Depicker A, Stachel S,
Dhaese P, Zambryski P, Goodman HM. Nopaline synthase: transcript
mapping and DNA sequence. J Mol Appl Genet. 1982;1(6):561-73.)
10 enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen
aus *Rattus norvegicus* wurde als EcoR5 Fragment aus dem Plasmid
pGEMTe/RnTATase in den pSUN2-USPP-*rbcS*-nost kloniert, nachdem
15 dieser mit dem Restriktionsenzym SmaI verdaut wurde. Dadurch
wurde eine Translationsfusion mit dem Transitpeptid der Ribulose-
Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) erzeugt und somit ein Import der
Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* in die Plastiden
gewährleistet.

20 Dieses Plasmid (pSUN2USPP-*rbcS*-RnTATase-nost, Abbildung 2) wird
zur Erzeugung transgener *Brassica napus* bzw. *A.thaliana* Pflanzen
verwendet.

25 Fragment A (678Bp) in Abbildung 2 beinhaltet den Promotor des Un-
know-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp)
kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxy-
lase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365 Bp) kodiert für das
Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D
30 (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase
Gens aus *A.tumefaciens*.

Beispiel 15

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Amino-
35 transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-
mensspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase
40 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen
Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) ver-
wendet.

Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen
45 Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein" (USPP) (Bäumlein
et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase
Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (GIELEN, J., de BEUCKELEER,

M., SEURINCK, J., DEBROECK, H., de GREVE, H., LEMMERS, M., van MONTAGU, M., SCHELL, J. The complete nucleotide sequence of the TL-DNA of the *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiAch5. *EMBO J.* 3: 835-846. (1984)) enthält.

5

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* wurde aus dem Plasmid pGEMTe/AttTATase1 als Sall Fragment isoliert, und nachdem die Sall Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt wurde, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym SmaI parcial verdaut wurde (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AttTATase1-nosT, Abbildung3) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

15 Fragment A (678Bp) in Abbildung 3 beinhaltet den Promotor des Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

20

Beispiel 16

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

25

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

30

Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *Agrobacterium* (Gielen et al. 1984) enthält.

35

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* wurde aus dem Plasmid pGEMTe/AttTATase3 als Sall Fragment isoliert, und nachdem das Sall Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt wurde, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym SmaI parcial verdaut wurde (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).

40

Dieses Plasmid (pSUN2USPP-AttTATase3-nosT, Abbildung 4) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

45

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 4 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

Beispiel 17

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *Agrobacterium* (Gielen et al. 1984) enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* wurde aus dem Plasmid pGEMTe/AtTATase5 als BamH1 Fragment isoliert, und nachdem das BamH1 Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt wurde, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym Sma1 parcial verdaut wurde (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT, Abbildung5) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 5 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

Beispiel 18

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen

Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen
5 Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens aus *Agrobacterium* (Gielen et al. 1984) enthält.
Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6
aus *Arabidopsis thaliana* wird aus dem Plasmid pGEMTe/AtTATase5
10 als SalI Fragment isoliert, die SalI Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt, in den pSUN2-USPP-nosT kloniert, der mit dem Restriktionsenzym SmaI parzial wird (Grösse des linearisierten Vektors 8250Bp).

15 Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT, Abbildung6) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 6 beinhaltet den Promotor des
"Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp)
20 kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens.

Beispiel 19

25 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
30 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotianum tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

35 Zuerst wurde der Vektor puc19 (New England Biolabs) so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., 1986), und das Terminationssignal der Nopalinsynthase aus *A.tumefaciens* (Depicker et al., 1982) enthält. Der resultierende Vektor heißt puc19-LeB4-nosT.

40 Das DNA Fragment kodierend für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* wurde als KpnI/SalI Fragment in puc19LeB4nosT kloniert, nachdem dieser mit den Restriktionsenzymen KpnI/SalI verdaut wurde.

Aus dem Vektor puc19-LeB4-NtGGPPOR-nosT, wurde die DNA bestehend aus LeB4-Promotor, Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen (Nucleotid 1 bis 1323 von Seq. ID 7) als Sma1/Hind3 Fragment isoliert und in den Vektor pSUN2 kloniert, nachdem dieser mit dem

5 Restriktionsenzym Sma1/Hind3 verdaut wurde. Der daraus resultierende Vektor heißt pSUN2-LeB4-NtGGPPOR(nuc.1-1323). Aus dem Vektor puc19-LeB4-NtGGPPOR-nosT, wurde die DNA bestehend aus Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen (Nucleotid 1319 bis 1509 von Seq. ID. No 17), nos-Terminationssequenz als Hind3 Fra-

10 gement isoliert und in den Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR(nuc.1-1323) eingefügt, nachdem dieser ebenfalls mit Hind3 geschnitten wurde.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT, Abbildung 7) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

15 Fragment A (2764 Bp) in Abbildung 7 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* und Fragment C kodiert (272Bp) für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

20

Beispiel 20

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

25

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (WO

30 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) (Bäumlein et al., 1988) und das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase-Gens aus *A.tumefaciens* (Depicker et al., 1982) enthält.

35

Das DNA Fragment kodierend für das Hydroxyphenylpyruvate-dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* wird aus dem Plasmid pGEMTe/AtHPPD als BamH1/Sall Fragment isoliert und nachdem das BamH1 Ende und

40 Sall Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt werden, in den mit dem Restriktionsenzym Sma1 parcial verdauten Vektor pSUN2-USPP-ocsT kloniert (Grösse des linearisierten Vektors 8691Bp).

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT, Abbildung 8) wird zur Er-

45 zeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 8 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338 Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 21

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (Wo 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des *Vicia faba* "Unknown-Seed-Protein-Gens" (USPP) (Bäumlein et al., 1991) und das Terminationssignal-1 des Nopalin-Synthase-Gens aus *A. tumefaciens* (Depicker et al., 1982) enthält.

Das DNA Fragment kodierend für das Homogentisinsäure Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* wird aus dem Plasmid pGEMTe/AtHPT als BamHI Fragment isoliert, die BamHI Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den SmaI parcial verdauten pSUN2-USPP-ocsT kloniert (Grösse des linearisierten Vektors 88691Bp).

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT, Abbildung 9) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678 Bp) in Abbildung 9 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1182 Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 22

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon Methyltransferas aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kon-

trolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des LeguminB4-Gens (Kafatos et al., 1986), die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) und das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens aus *A.tumefaciens* (Depicker et al., 1982)) enthält.

10

Das DNA Fragment kodierend für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 wird aus dem Plasmid pGEMTe/SynMT1 als BamH1 Fragment isoliert, die BamH1 Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den Sall verdauten pSUN2-Leb4P-IPP-nosT kloniert, dessen Sall Enden ebenfalls mit dem Klenow Enzym aufgefüllt werden. Dadurch wird eine Translationsfusion mit dem Transitpetid der IPP-2 erzeugt und somit ein Import der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase in den Chloroplasten gewährleistet.

20

Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-IPP-SynMT1-nosT, Abbildung 10) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2764 Bp) in Abbildung 10 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957 Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803 und Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

30

Beispiel 23

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

35

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wird der Vektor pSUN2 (Wo 02/00900) verwendet.

40

Dieser Vektor wird so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des Legumin-B4-Gens (Kafatos et al., 1986), die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) und das Ter-

45

minationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A. tumefaciens* (Depicker et al., 1982) enthält.

- Das DNA Fragment kodierend für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplasto-
- 5 chinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 wird aus dem Plasmid pGEMTe/SynCyc als BamH1 Fragment isoliert, die BamH1 Ende werden mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den SalI verdauten
- pSUN2-Leb4P-IPP-nosT kloniert, dessen SalI Enden ebenfalls mit dem Klenow Enzym aufgefüllt werden. Dadurch wird eine Translati-
- 10 onsfusion mit dem Transitpetid der IPP-2 erzeugt und somit ein Import der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplasto chinol-Zyklase in den Chloroplasten gewährleistet. Dieses Plasmid (pSUN2-Leb4P-IPP-SynCyc-nosT, Abbildung 11) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.
- 15 Fragment A (2764 Bp) in Abbildung 11 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A. thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100 Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplasto chinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. und
- 20 Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

Beispiel 24

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der γ -Tocopherol-Me-
- 25 thyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die γ -Tocopherol-Methyltrans-
- 30 ferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, wurde der Vektor pSUN2 (WO 02/00900) verwendet.

- Zuerst wurde der Vektor puc19 (New England Biolabs) so verändert,
- 35 dass er den samenspezifischen Promotor des Sucrose-Binding-Protein-Gens (SBP-P) (DE 19852195 C2) und die 35s-Terminationssequenz des Blumenkohlmosaikvirus (FRANCK, A., GUILLEY, H., JONARD, G., RICHARDS, K., HIRTH, L. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. Cell 21: 285-294. (1980)) enthält. Der resul-
- 40 tierende Vektor heißt puc19-SBPP-35ST.

- Das DNA Fragment kodierend für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* wurde als BamH1/SalI Fragment in
- puc19-SBPP-AtyTMT-35ST kloniert, nachdem dieser mit dem Restrikti-
- 45 onsenzym BamH1/SalI verdaut wurde.

Mittels PCR wurde die Expressionkassette bestehend aus: SBP-Promotor, γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und 35sT Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (SBPP-XbaI 5': SEQ. ID. No. 50) und eines antisense spezifischen Primers (35ST-XbaI 3': SEQ. ID. No. 51), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

10 Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1 μ l einer puc19-SBPP-At γ TMT-35ST Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 15 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol SBPP-XbaI 5'Primer
- 40pmol 35ST-XbaI 3'Primer
- 5 μ l 10x PfuI DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U PfuI DNA Polymerase (Stratagene)

20 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

25 Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

30 Das DNA Fragment bestehend aus SBP-Promotor, γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und 35ST Terminationssequenz wurde aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/SBPP- γ TMT-35ST als XbaI Fragment isoliert und in den Vektor pSUN2 kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut wurde.

35 Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP- γ TMT-35ST, Abbildung 12) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

40 Fragment A (1788Bp) in Abbildung 12 beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (291Bp) kodiert für den 35s-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

Beispiel 25

45 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression des Tyrosin-Aminotransferase Gens aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors, in Kombination mit der samenspezifischen

schen Unterdrückung der Expression des Homogentisat-Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*.

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
5 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren und gleichzeitig die samenspezifische Unterdrückung der Expression des Homogentisat-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* vermitteln, wurde der Vektor pSUN2-Pvic-
10 BnHGD*-STLS1- α BnHGD*-ocsT und der Vektor pSUN2USPP-rbcS-RnTATase-nosT, verwendet.

- Aus dem Vektor pSUN2USPP-rbcS-RnTATase-nosT, wurde mittels PCR die Expressionkassette bestehend aus: USP-Promotor, rbcS Transit-
15 peptid, Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (USPP-Srf1 5': SEQ. ID. No. 52) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-Srf1 3': SEQ. ID. No. 53), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert.

20

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 25 - 1 μ l des pSUN2-USPP-rbcS-RnTATase-nosT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol USPP-Srf1 5'Primer
- 40pmol nosT-Srf1 3'Primer
30 - 5 μ l 10x PfuI Turbo DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U PfuI Turbo DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

35

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

Schritt 4: 8 Minuten 68°C (Elongation)

40 30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

- Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, rbcS Transitpeptid, Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* und nos Ter-
45 minationssequenz wurde aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnATase-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den

71

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym EcoR5 verdaut wurde.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-USPP-rbcS-
5 RnATase-nosT, Abbildung 13) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 13 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein-
10 en Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus* und Fragment C (198Bp) kodiert für das 2. Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens.
15 Fragment F (678 Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (rbcS) aus *Vicia faba*. Fragment H (1365 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* und Fragment I (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthese-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.
20

Beispiel 26

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*
25
30 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch
35 unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT und der Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend
40 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1 Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wurde aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als EcoR1/SmaI Fragment isoliert, das EcoR1 Ende wurde mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR5 verdauten pSUNPvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT/USPP-AtTA-Tasel-nosT Abbildung 14) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

- 5 Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 14 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2. Intron (IV2) des STLS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit
- 10 Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin-Gens. Fragment
- Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment G (1269Bp) kodiert für
- 15 das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase Gens.

Beispiel 27

- 20 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*
- 25 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch
- 30 unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT und der Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.
- 35 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATasel-nosT als EcoR1/SmaI Fragment isoliert, das EcoR1 wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR5
- 40 verdauten pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT/USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 15) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

73

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 15 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-
 5 LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment G (1334Bp) kodiert für
 10 das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase Gens.

Beispiel 28

15 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin- Amino-transferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*

20

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogen-
 25 tisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT und der Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst miteinander kombiniert.

30 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoRI
 35 verdauten pSUNPvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst/USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 16) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

40

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 16 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-
 45 LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens.

Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens.

Beispiel 29

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, wurden die Vektoren pSUN2-USPP-AttATase6-nost und der Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AttATase6-nost als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoRI verdauten pSUNPvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst/USPP-AttATase6-nost Abbildung 17) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 17 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des STLS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens.

Beispiel 30

75

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphat-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LEB4-NtGGPPOR-nosT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPoblunt/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XhoI Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT Abbildung 18) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 18 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A. tumefaciens*.

Fragment E (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment F (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

Beispiel 31

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

76

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTA-Tase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-Tase1-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XhoI Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT/USPP-AtTATase1-nosT Abbildung 19) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (678Bp) in Abbildung 19 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

30 Beispiel 32

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTA-Tase3-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-

Tase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XhoI Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

5

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 20) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

- 10 Fragment A (678Bp) in Abbildung 20 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und. Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

20 Beispiel 33

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

25 spezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

- 30 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit XhoI verdauten Vektor
- 40 pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XhoI Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 21) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen

45 verwendet

Fragment A (678Bp) in Abbildung 21 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalins-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalins-Synthase-Gens

10

Beispiel 34

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

25

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert, dessen XhoI Enden zuvor mit dem Klenow Enzym geglättet werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 22) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 22 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalins-Synthase-Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum*. Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalins-Synthase-Gens

Beispiel 35

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Ara-*
 5 *bidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase
 10 aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATase1-nosT miteinander kombiniert.

15 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-
 20 AthHPPD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT Abbildung 23) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

25 Fragment A (678Bp) in Abbildung 23 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert
 30 für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A. tumefaciens*.
 Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1338Bp) kodiert für das
 35 Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*.
 Fragment G (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 36

40 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AthPPD-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AthPPD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AthPPD-ocsT /USPP-AtTATase1-nosT Abbildung 24) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (678Bp) in Abbildung 24 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 37

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AthPPD-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird

mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT /USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 25) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 25 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 38

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-AtYMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT /USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 26) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 26 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den

Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

5

Beispiel 39

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxyge-
10 nase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6
15 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nost miteinander kombiniert.

20

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nost als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird
25 mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPPD-ocsT/USPP-AtTATase6-nost Abbildung 27) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen
30 verwendet

Fragment A (678Bp) in Abbildung 27 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis*
35 *thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Ter-
40 minationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 40

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspe-
45 zifischen Promotors und Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus

Arabidopsis thaliana unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT Abbildung 28) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (678Bp) in Abbildung 28 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodierend für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A. tumefaciens*.

Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 41

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden

die Vektoren pSUN2-USPP-AthPT-ocst und pSUN2-USPP-AtTATase1-nost miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nost als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AthPT-ocst kloniert.

10

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AthPT-ocst/USPP-AtTATase1-nost Abbildung 29) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

15 Fragment A (678Bp) in Abbildung 29 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phenyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

25 Beispiel 42

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phenyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phenyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AthPT-ocst und pSUN2-USPP-AtTATase3-nost miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nost als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AthPT-ocst kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT /USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 30) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

5 Fragment A (678Bp) in Abbildung 30 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

15 Beispiel 43

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

30 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AtHPT-ocsT/USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 31) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

40

Fragment A (678Bp) in Abbildung 31 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-

Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 44

- 5 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors
- 10 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren,
- 15 werden die Vektoren pSUN2-USPP-AthPT-ocsT und pSUN2-USPP-AtTA-Tase6-nosT miteinander kombiniert.
- Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis*
- 20 *thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-Tase6-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AthPT-ocsT kloniert.
- 25 Dieses Plasmid (pSUN2-USPP-AthPT-ocsT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 32) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

- Fragment A (678Bp) in Abbildung 32 beinhaltet den Promotor des
- 30 "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment
- 35 E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 45

- 40 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2-Me-

- 5 thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTA-Tasel-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPoblunt/USPP-rbcS-RnTATasel-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

- 15 Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-rbcS-RnTA-Tasel-nosT Abbildung 33) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 33 beinhaltet den Promotor des
20 LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-
25 lin-Synthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment G (1365Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Frag-
30 ment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase Gens aus *A.tumefaciens*.

Beispiel 46

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-
35 transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2-Me-thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

- 40 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und 2-Me-thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp.
45 PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren

pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

10

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-AtTATase1-nosT Abbildung 34) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

- 15 Fragment A (2764Bp) in Abbildung 34 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803.
- 20 Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopal-Synthase Gens.
- 25

Beispiel 47

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors
- 30

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren
- 35
- 40 pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

- Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird
- 45

mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT /USPP-AtTATase3-nosT
5 Abbildung 35) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 35 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das
10 Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des
15 "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens.

20 Beispiel 48

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp.

25 PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen

30 Promotors exprimieren, und die 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

35

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit
40 dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-AtTATase5-nosT
Abbildung 36) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen
45 verwendet:

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 36 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens

Beispiel 49

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors
- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 37) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- Fragment A (2764Bp) in Abbildung 37 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1243 Bp)

91

kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

5 Beispiel 50

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

10

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen

15

Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATase1-nosT miteinander kombiniert.

20

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit EcoRI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoRI Enden ebenfalls

25 aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT Abbildung 38) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

30

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 38 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment G (1365Bp) kodiert für das

35 Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A.tumefaciens*.

Beispiel 51

45

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochi-

nol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
 5 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1
 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen
 Promotors exprimieren, und 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol-Zy-
 klase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen expremie-
 ren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und
 10 pSUN2-USPP-AtTATasel-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend
 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis*
thaliana und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-
 15 Tasel-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit
 dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoRI verdauten Vektor
 pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoRI Enden mit dem
 Klenow Enzym aufgefüllt werden.

20 Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-AtTATasel-nosT
 Abbildung 39) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflan-
 zen verwendet

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 39 beinhaltet den Promotor des
 25 LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das
 Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isome-
 rase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phy-
 tylplastoquinol 'Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Frag-
 ment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-
 30 Synthase- Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des
 Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F
 (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Ara-
 bidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Termini-
 onssignal des Nopalin-Synthase Gens.

35

Beispiel 52

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-
 transferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-
 mensspezifischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoichi-
 40 nol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines
 samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3
 45 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen
 Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol-
 Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen expremie-

ren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend
5 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI wird mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoRI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoRI Enden ebenfalls
10 aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 40) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

15

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 40 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phy-
20 tylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment F (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Ara-*
25 *bidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens.

Beispiel 53

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-
30 transferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastocho-
linol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

35 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastocho-
linol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen expremie-
40 ren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis*
45 *thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoRI verdauten Vektor

pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoR1 Enden ebenfalls aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT /USPP-AtTATase5-nosT
5 Abbildung 41) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 41 beinhaltet den Promotor des
LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das
10 Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isome-
rase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phy-
tylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Frag-
ment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-
Synthase- Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des
15 "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1389Bp)
kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis*
thaliana. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal
des Nopalin-Synthase Gens.

20 Beispiel 54

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-
transferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines sa-
mensspezifischen Promotors und der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplasto-
chinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 unter Kontrolle eines
25 samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
gener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6
aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen
30 Promotors exprimieren, und die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplasto-
chinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp. PCC6803 samenspezifischen expremie-
ren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT und
pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

35 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend
aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis*
thaliana und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTA-
Tase6-nosT als Sma1/EcoR1 Fragment isoliert, das EcoR1 Ende wird
mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit EcoR1 verdauten
40 Vektor pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT kloniert, dessen EcoR1 Enden
ebenfalls aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT/USPP-AtTATase6-nosT
Abbildung 42) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflan-
45 zen verwendet:

Fragment A (2764Bp) in Abbildung 42 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytolplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment E (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknown-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment F (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

Beispiel 55

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT und pCR4topoblunt-USPP-rbcS-RnTATase1-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT/USPP-rbcS-RnTATase1-nosT Abbildung 43) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (678Bp) in Abbildung 43 beinhaltet den Promotor des Unknown-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der Ribulose-Bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Vicia faba*. Fragment C (1365Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens aus *A.tumefaciens*. Fragment E (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment F (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment G (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvirus.

Beispiel 56

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 1 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der γ -Tocopherol Methyltransferase
5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-1
10 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die γ -Tocopherol Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT miteinander kombiniert.

15

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-1-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit
20 dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-SBPP-At γ TMT-35sT/USPP-AtTATase1-nosT Abbildung 44) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen
25 verwendet:

Fragment A (678Bp) in Abbildung 44 beinhaltet den Promotor des Unknow-Seed-Protein-Gens (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1269Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 1 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.
30
35

Beispiel 57

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Amino-transferase 3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors
40

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-3 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die γ -Tocopherol-Methyltransferase aus
45

Arabidopsis thaliana samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT miteinander kombiniert.

- 5 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-3-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase3-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor
- 10 pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT/USPP-AtTATase3-nosT Abbildung 45) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

- 15 Fragment A(678Bp) in Abbildung 45 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" (USPP) aus *Vicia faba*, Fragment B (1334Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 3 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.
- 20

- 25 Beispiel 58
Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 5 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der γ -Tocopherol-Methyltransferase
- 30 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-5
- 35 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT miteinander kombiniert.

- 40 Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-5-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase5-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit
- 45 dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT kloniert..

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT /USPP-AtTATase5-nosT Abbildung 46) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet

- 5 Fragment A (678Bp) in Abbildung 46 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1389Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 5 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet
- 10 den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

15 Beispiel 59

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin Aminotransferase 6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen

20 Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosin-Aminotransferase-6 aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die γ -Tocopherol-Methyltransferase aus

- 25 *Arabidopsis thaliana* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT und pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend

30 aus: USP-Promotor, Tyrosin-Aminotransferase-6-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pSUN2-USPP-AtTATase6-nosT als SmaI/EcoRI Fragment isoliert, das EcoRI Ende mit dem Klenow Enzym aufgefüllt und in den mit SrfI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT kloniert.

35

Dieses Plasmid (pSUN2-SBPP-At γ TMT-35sT/USPP-AtTATase6-nosT Abbildung 47) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- 40 Fragment A (678Bp) in Abbildung 47 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1243 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen 6 aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens. Fragment D (1788Bp) beinhaltet
- 45 den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis*

thaliana, Fragment F (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohl-mosaikvirus.

Beispiel 60

- 5 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*

10

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der

- 15 endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-LeB4-NtGGPPOR-nosT (s.u.) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

- 20 Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* und nos-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (LeB4-SRF1 5': SEQ. ID. No. 54) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-SRF1 3' SEQ. ID. No. 25 53), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert.

Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-LeB4-NtGGPPOR-nosT
Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 30 Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1 μ l einer puc19-LeB4-NtGGPPOR-nosT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 35 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol LeB4-Srf1 5'Primer
- 40pmol nosT-Srf1 3'Primer
- 5 μ l 10x PfuI DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U PfuI DNA Polymerase (Stratagene)

- 40 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

- 45 Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

100

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das DNA Fragment kodierend für die Expressionskassette bestehend aus: LeB4-Promotor, Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-

- 5 Gen aus *Nicotiana tabacum* und nos-Terminator wird aus dem Plasmid pCR4topoblunt-LeB4-NtGGPPOR-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit EcoRI verdauten pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert.

- 10 Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT/LeB4-NtGGPPOR-nosT Abbildung 48) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 48 beinhaltet den Promotor des
15 Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) für das 2. Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp)
20 kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment G (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment H (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens
25

Beispiel 61

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines
30 samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*.

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-USPP-
40 AtHPPD-ocsT (s.u.) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

Mittels PCR wird die Expressionskassette bestehend aus: USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana*

- 45 und ocs-Terminationssequenz-1, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (USPP-SRF1-5': SEQ. ID. No. 52) und eines antisense spezifischen Primers (ocsT-SRF1-3': SEQ. ID. No. 55), am-

101

plifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-USPP-AthHPPD-ocsT.

5 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1µl einer pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT Plasmid-DNA
- 10 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol USPP-SRF1 5'Primer
- 40pmol ocsT-SRF1 3'Primer
- 5µl 10x Pfu DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 15 - 5U Pfu DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

20 Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

25 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AthHPPD-ocsT als Srf1 Fragment isoliert und in den mit EcoR5 verdauten Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT kloniert.

30

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1-α*BnHGD-ocsT/USPP-AthHPPD-ocsT Abbildung 49) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

35 Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 49 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B

40 jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens.

Fragment F (678Bp) kodiert beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis*

45 *thaliana*. Fragment H (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase.

Beispiel 62

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Homogentisinsäure Phtyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Homogentisinsäure-Phtyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-USPP-AthPT-ocsT (siehe nachstehend) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: USP-Promotor, der Homogentisinsäure-Phtyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (USPP-SRF1-5' SEQ. ID. No. 52) und eines antisense spezifischen Primers (ocsT-SRF1-3' SEQ. ID. No. 55), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert.

Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-USPP-AthPT-ocsT. Die PCR Bedingungen waren die folgenden:
Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1 μ l einer pSUN2-USPP-AthPT-ocsT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol USPP-SRF1 5'Primer
- 40pmol ocsT-SRF1 3'Primer
- 5 μ l 10x Pfu DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U Pfu DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
- Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
- Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)
- 30 Wiederholungen der Schritte 2-4
- Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

103

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz-1 wird aus dem Plasmid pCR4TOPoblunt/USPP-AtHPT-ocsT als SrfI Fragment isoliert und in den mit EcoR5 verdauten

5 Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT/USPP-AtHPT-ocsT Abbildung 50) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

10

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 50 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2. Intron (IV2) des ST-

- 15 LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment G (1182Bp) kodiert für das
- 20 Homogentisinsäure-Phytyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment H (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 63

- 25 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus*

30

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors expri-

- 35 mieren, und die Expression der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMtl-nosT (s.u.) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.

- 40 Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol-Methyltranserase aus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-Terminationssequenz, unter Ver-
- 45 wendung eines sense spezifischen Primers (LeB4-SRF1-5': SEQ. ID. No. 54) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-SRF1-3': SEQ. ID. No. 53), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt

104

(Invitrogene) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topo-blunt-LeB4-IPP-SynMT1-nosT.

Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

- 5 Die PCR erfolgte in einem 50µl Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1µl einer pSUN2-LeB4-IPP-SynMT1-nosT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 10 - 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5µg Rinderserum-Albumin
- 40pmol LeB4-SRF1 5'Primer
- 40pmol nosT-SRF1 3'Primer
- 5µl 10x PfuI DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U PfuI DNA Polymerase (Stratagene)

- 15 Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94° (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°

Schritt 3: 1 Minute 55° (Annealing)

- 20 Schritt 4: 10 Minuten 68° (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72° (Post-Elongation)

- 25 Das DNA Fragment bestehend aus LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-erminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPO-blunt/LeB4-IPP-SynMT1-nosT als Srf1 Fragment isoliert und in den
- 30 mit EcoR5 verdauten Vektor pSUN2-ic-*nHGD-STLS1-α*nHGD-ocsT kloniert.

- 35 Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*nHGD-STLS1-α*nHGD-ocsT/USPP-LeB4-IPP-SynMT1-nosT Abbildung 51) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 51 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein
- 40 en Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit
- Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens
- 45 aus *Vicia faba*, Fragment G (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment H (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltrans-

105

ferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment I (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

Beispiel 64

- 5 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* spec PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure Dioxygenase Gens aus *Brassica napus*
- 10 Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* spec PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Expression
- 15 der endogenen Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezifisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynCyc-nosT (s.u.) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT miteinander kombiniert.
- 20 Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *Arabidopsis thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* spec PC6808 und nos-Terminationssequenz, unter
- 25 Verwendung eines sense spezifischen Primers (LeB4-EcoR5-5': SEQ. ID. No. 56) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-EcoR5-3': SEQ. ID. No. 57), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMtl-nosT
- 30 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:
Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:
- 35 - 1 μ l einer pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nosT Plasmid-DNA
- 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol LeB4-EcoR5 5'Primer
- 40pmol nosT-EcoR5 3'Primer
- 40 - 5 μ l 10x PfuI DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 5U PfuI DNA Polymerase (Stratagene)
- Die PCR wurde unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:
- Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)
- 45 Schritt 2: 3 Sekunden 94°C
Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)
Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

106

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

Das DNA Fragment bestehend aus LeB4-Promotor, die Sequenz kodier-
 5 end für das Transitpeptid der *Arabidopsis thaliana* plastiden-spe-
 zifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) , der
 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis* sp.
 PCC6803 und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TO-
 POblunt/LeB-IPP-SynCyc-nosT als EcoR5 Fragment isoliert und in
 10 den mit EcoR5 verdauten Vektor pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-
 ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT/LeB-IPP-Syn-
 Cyc-nosT Abbildung 52) wird zur Erzeugung transgener *Brassica na-*
 15 *pus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 52 beinhaltet den Promotor des
 Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein-
 en Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica*
 20 *napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-
 LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit
 Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment
 E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal des Octopin Gens.
 Fragment F (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens
 25 aus *Vicia faba*, Fragment G (235Bp) kodiert für das Transitpeptid
 der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment H
 (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phytylplastoquinol Zy-
 klase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment I (272Bp) ko-
 diert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens.

30

Beispiel 65

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der γ -Tocopherol Me-
 thyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines
 samenspezifischen Promotors und zur samenspezifischen Unterdrück-
 35 kung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus
Brassica napus.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die γ -Tocopherol Methyltrans-
 40 ferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezi-
 fischen Promotors exprimieren, und die Expression der endogenen
 Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens aus *Brassica napus* samenspezi-
 fisch unterdrücken, werden die Vektoren pCR4topoblunt-SBPP-
 γ TMT-35sT (s.u.) und pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT mitein-
 45 ander kombiniert.

Mittels PCR wird die Expressionkassette bestehend aus: LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und nos-Terminationssequenz, unter Verwendung eines sense spezifischen Primers (SBPP-SRF1-5': SEQ. ID. No. 58) und eines antisense spezifischen Primers (nosT-SRF1-3' SEQ. ID. No. 53), amplifiziert und in den Vektor pCR4topoblunt (Invitrogene) kloniert. Das resultierende Plasmid ist pCR4topoblunt-SBPP- γ TMT-35sT.

10 Die PCR Bedingungen waren die folgenden:

Die PCR erfolgte in einem 50 μ l Reaktionsansatz in dem enthalten war:

- 1 μ l einer pSUN2-SBPP- γ TMT-35sT Plasmid-DNA
- 15 - 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP, dCTP
- 1,5 mM Mg(OAc)₂
- 5 μ g Rinderserum-Albumin
- 40pmol SBPP-SRF1 5'Primer
- 40pmol 35sT-SRF1 3'Primer
- 5 μ l 10x PfuI DNA Polymerase Puffer (Stratagene)
- 20 - 5U PfuI DNA Polymerase (Stratagene)

Die PCR wird unter folgenden Zyklus Bedingungen durchgeführt:

Schritt 1: 5 Minuten 94°C (Denaturierung)

Schritt 2: 3 Sekunden 94°C

25 Schritt 3: 1 Minute 55°C (Annealing)

Schritt 4: 10 Minuten 68°C (Elongation)

30 Wiederholungen der Schritte 2-4

Schritt 5: 10 Minuten 72°C (Post-Elongation)

30 Das DNA Fragment bestehend aus LeB4-Promotor, die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2), der γ -Tocopherol Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und nos- Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/SBPP- γ TMT-35sT als SrfI

35 Fragment isoliert und in den mit EcoR5 verdauten Vektor

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT/SBPP-

γ TMT-35sT Abbildung 53) wird zur Erzeugung transgener *Brassica na-*

40 *pus* Pflanzen verwendet:

Fragment A (2559 Bp) in Abbildung 53 beinhaltet den Promotor des Vicilin-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (580 Bp) kodiert für ein

Fragment des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gen aus *Brassica*

45 *napus*. Fragment C (190Bp) kodiert für das 2 Intron (IV2) des ST-

108

LS1 Gens aus *Solanum tuberosum*. Fragment D ist identisch mit Fragment B jedoch im Vektor gegenläufig zu B orientiert. Fragment E (208Bp) kodiert für das Terminationssignal-2 des Octopin Gens. Fragment F (1788Bp) beinhaltet den Promotor des SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment G (1047Bp) kodiert für das γ -Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment H (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvirus.

Beispiel 66

- 10 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

15

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-NtGGPPOR-nosT und pCR4topoblunt-USPP-AthHPPD-ocsT miteinander kombiniert.

- Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AthHPPD-ocsT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SmaI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT kloniert.

- 30 Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-NtGGPPORnosT/USPP-AthHPPD-ocsT Abbildung 54) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.

- Fragment A (678Bp) in Abbildung 54 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment F (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens.

Beispiel 67

- 45 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Homogentisinsäure-Phenyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranylpyro-

phosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Homogentisinsäure-Phenyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, und die Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT und
 10 pCR4topoblunt-USPP-AtHPT-ocsT miteinander kombiniert.

Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Homogentisinsäure-Phenyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AtHPT-ocsT als
 15 SrfI Fragment isoliert und in den mit SmaI verdauten Vektor pSUN2-LeB-NtGGPPOR-nosT kloniert.

Dieses Plasmid (pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT/USPP-AtHPT-ocsT Abbildung 55) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen
 20 verwendet:

Fragment A (678Bp) in Abbildung 55 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phenyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreductase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment F (272Bp) kodiert für das
 25 Terminationssignal des Nopalinsynthase-Gens.
 30

Beispiel 68

Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines
 35 samenspezifischen Promotors, der 2-Methyl-6-Phenylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und γ -Tocopherol Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

40

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, 2-Methyl-6-Phenylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren und γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana*

unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-SBPP-AtγTMT35ST und pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMT1-nosT und pCR4topoblunt-USPP-AthHPPDocst miteinander kombiniert.

- 5 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz-1 wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AthHPPD-ocsT als SrfI Fragment isoliert und in den mit SrfI verdauten Vektor
- 10 pSUN2-SBPP-AtγTMT 35ST kloniert, der zuvor ebenfalls mit dem Restriktionsenzym SrfI verdaut wird. In das entstandene Plasmid pSUN2-SBPP-AtγTMT-35sT/ USPP-AthHPPD-ocsT, wird das DNA Fragment bestehend aus LeB-Promotor, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec*
- 15 PC6808 und nos-Terminationssequenz aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/LeB-SynMT1-nosT als SrfI Fragment isoliert und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-SBPP-AtγTMT35sT/USPP-AthHPPD-ocsT kloniert, nachdem die XhoI Enden aufgefüllt wurden.
- 20 Dieses Plasmid pSUN2-SBPP-AtγTMT35sT/USPP-AthHPPD-ocsT/LeB-SynMT1-nosT Abbildung 56) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- Fragment A (1788Bp) in Abbildung 56 beinhaltet den Promotor des
- 25 SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1047Bp) kodiert für das γ-Tocopherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment C (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvirus. Fragment D (678Bp) beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1338Bp) kodiert für das
 - 30 Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment G (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment H (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment I (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis sp.* PCC6803.
 - 35 Fragment J (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalins-Synthase-Gens.

40 Beispiel 69

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors, der 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec*
- 45 PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors

111

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors werden und pSUN2-USPP-AthHPPDocst und der Vektor pCR4topoblunt-LeB4-IPP-SynMT1-nost miteinander kombiniert.

- 10 Das DNA Fragment bestehend aus LeB-Promotor, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4TOPO-blunt/LeB-SynMT1-nost als SrfI Fragment isoliert und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT kloniert, dessen
- 15 XhoI Enden aufgefüllt werden.

Dieses Plasmid pSUN2-USPP-AthHPPD-ocsT/LeB-SynMT1-nost Abbildung 57) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet:

- 20 Fragment A (678Bp) in Abbildung 57 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminations-
- 25 onssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (235Bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenylpyrophosphat-Isomerase-2. Fragment F (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhydrochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Fragment G (272Bp) kodiert für das Terminations-
- 30 onssignal des Nopalins-Synthase-Gens.

Beispiel 70

- Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines
- 35 samenspezifischen Promotors und der Geranylgeranyl-pyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und der Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.
- 40

- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, die Geranylgeranyl-pyrophosphate-Oxidoreductase aus *Nicotiana tabacum* samenspezifischen
- 45 exprimieren, und Homogentisinsäure-Phytyltransferase aus *Arabidop-*

sis thaliana samenspezifischen exprimieren, werden die Vektoren pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nost/USPP-AthHPT-ocsT und pCR4topoblunt-USPP-AthHPPD-ocsT miteinander kombiniert.

- 5 Das DNA Fragment bestehend aus USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *Arabidopsis thaliana* und ocs-Terminationssequenz-1 wird aus dem Plasmid pCR4TOPOblunt/USPP-AthHPPD-ocsT als SrfI Fragment isoliert und in den mit XhoI verdauten Vektor pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nost/USPP-AthHPT-ocsT kloniert, nachdem die
- 10 XhoI Enden zuvor mit der Klenow Polymerase geglättet werden. Dieses Plasmid (pSUN2LeB4-NtGGPPORnost/USPP-AthHPPD-ocsT/USPP-AthHPT-ocsT Abbildung 58) wird zur Erzeugung transgener *Brassica napus* Pflanzen verwendet.
- 15 Fragment A (678Bp) in Abbildung 58 beinhaltet den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment B (1338Bp) kodiert für das Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment C (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment D (678Bp) beinhaltet
- 20 den Promotor des "Unknow-Seed-Protein-Gens" aus *Vicia faba*, Fragment E (1182Bp) kodiert für das Homogentisinsäure-Phenyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*. Fragment F (713Bp) kodiert für das Terminationssignal-1 des Octopin-Synthase Gens. Fragment G (2764Bp) beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia*
- 25 *faba*, Fragment H (1509Bp) kodiert für das Geranylgeranylpyrophosphate-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum* Fragment I (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-Synthase-Gens:
- 30 Beispiel 71
Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der 2,3-Dimethyl-5-Phenylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors, der 2-Methyl-6-Phenylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec*
- 35 PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors und γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors.
- Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
- 40 gener *Brassica napus* Pflanzen, die die 2,3-Dimethyl-5-Phenylplastochinol-Zyklase aus *Synechocystis spec* PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren, 2-Methyl-6-Phenylhydrochinon-Methyltransferase aus *Synechocystis spec*
- 45 PC6808 unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren und γ -Tocopherol-Methyltransferase aus *Arabidopsis thaliana* unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren,

113

werden die Konstrukte pSUN2-SBPP-AtγTMT35ST/USPP-AthHPPD-ocsT/LeB-SynMT1-nosT und pCR4topoblunt/LeB-IPP-SynCyc-nosT verwendet.

Das DNA Fragment bestehend aus LeB-Promotor, 2,3-Dimethyl-5-Phy-
 5 tylplastochoinol-Zyklase aus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-
 Terminationssequenz wird aus dem Plasmid pCR4topoblunt/LeB-IPP-
 SynCyc-nosT als EcoR5 Fragment isoliert und in den mit Srf1 ver-
 dauten Vektor pSUN2-SBPP-AtγTMT-35ST/USPP-AthHPPD-ocsT/LeB-
 SynMT1-nosT kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym Srf1
 10 verdaut wird. Dadurch wird die Expressionkassette bestehend aus
 USP-Promotor, Hydroxyphenylpyruvat-Dehydrogenase-Gen aus *Arabi-
 dopsis thaliana* und ocs-Terminationsequenz gegen die Expression-
 kassette bestehend aus LeB-Promotor, die 2,3-Dimethyl-5-Phytyl-
 plastochinol- Zyklase-Genaus *Synechocystis spec* PC6808 und nos-
 15 Terminationssequenz, ausgetauscht.

Dieses Plasmid pSUN2-SBPP-AtγTMT35sT/LeB-IPP-SynCyc-nosT/LeB-IPP-
 SynMT1-nosT Abbildung59) wird zur Erzeugung transgener *Brassica
 napus* Pflanzen verwendet.

20 Fragment A (1788Bp) in Abbildung 59 beinhaltet den Promotor des
 SBP-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (1047Bp) kodiert für das γ-To-
 copherol-Methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Fragment
 C (291Bp) kodiert für den 35S-Terminator des Blumenkohlmosaikvi-
 25 rus. Fragment D (2764Bp) beinhaltet den Promotor des Legu-
 minB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment E (235Bp) kodiert für das
 Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isome-
 rase-2. Fragment F (1100Bp) kodiert für das 2,3-Dimethyl-5-Phy-
 tylplastoquinol Zyklase Gen aus *Synechocystis sp.* PCC6803. Frag-
 30 ment G (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopalin-
 Synthase- Gens. Fragment H (2764Bp) beinhaltet den Promotor des
 LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment I (235Bp) kodiert für das
 Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isome-
 rase-2. Fragment J (957Bp) kodiert für das 2-Methyl-6-Phytylhy-
 35 drochinol Methyltransferase Gen aus *Synechocystis sp.* PCC6803.
 Fragment K (272Bp) kodiert für das Terminationssignal des Nopa-
 lin-Synthase-Gens.

Beispiel 72

40 Erzeugung von DNA Konstrukten zur Expression der Tyrosin-Amino-
 transferase aus *Rattus norvegicus* unter Kontrolle eines samenspe-
 zifischen Promotors.

Zur Herstellung von chimären DNA Konstrukten zur Erzeugung trans-
 45 gener *A.thaliana*, *Nicotiana tabacum* bzw. *B.napus* Pflanzen, die
 die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Seq. ID. No.
 1) unter Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimieren,

wurde ein Derivat des Vektors pGPTVkan (D.Becker, E. Kemper, J. Schell, R. Masterson. *Plant Molecular Biology* 20: 1195-1197, 1992) verwendet.

- 5 Dieser Vektor wurde so verändert, dass er den samenspezifischen Promotor des Legumin B4 Gens (Kafatos et al., *Nuc. Acid. Res.*, 14(6):2707-2720, 1986), die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) (Badur, unveröffentlicht) und das
 10 Terminationssignal der Nopalinsynthase aus *A.tumefaciens* (Depicker et al., *J. Mol. Appl. Genet.* 1, 561-73, 1982) enthält.

- Das DNA Fragment kodierend für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus* wurde als EcoR5 Fragment in den pPTVkan-
 15 LeP-IPPTP11 kloniert, nachdem dieser mit dem Restriktionsenzym SalI verdaut und die Enden des linearisierten Plasmides mit dem Klenow Enzym in glatte Enden überführt wurden. Dadurch wurde eine Translationsfusion mit dem Transitpeptid der IPP-2 erzeugt und somit ein Import der Tyrosin-Aminotransferase in die Plastiden
 20 gewährleistet. Dieses Plasmid pPTVkan-IPPTP11-TATaseRNnos (oder auch pPTVkan-LeB4-IPP-RnTATase-nosT bezeichnet, Abbildung 60) wurde zur Erzeugung transgener *Brassica Napus* bzw. *A. thaliana* Pflanzen verwendet.

- 25 Fragment A (2764 bp) in Abbildung 60 beinhaltet den Promotor des LeguminB4-Gens aus *Vicia faba*, Fragment B (207bp) kodiert für das Transitpeptid der *A.thaliana* Isopentenyl-pyrophosphat-Isomerase-2. Fragment C (1377 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*. Fragment D (272Bp) kodiert für
 30 das Terminationssignal des Nopalinsynthase Gens.

Beispiel 73

- Herstellung von Expressionskassetten enthaltend das Tyrosin-Aminotransferase-Gen aus *Rattus norvegicus*
 35

- Transgene *Nicotiana tabacum* und *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden erzeugt, die die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* (Seq. ID. No. 1) unter Kontrolle des konstitutiven
 40 35S-Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., *Cell* 21: 285-294, 1980) exprimieren.

- Die Grundlage des zur konstitutiven Expression der Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Rattus norvegicus* erzeugten Plasmides war der
 45 pBinAR-IPP-Tp-10 (Ralf Badur, Dissertation Universität Göttingen, 1998). Dieser Vektor ist ein Derivat des pBinAR (Höfgen und Willmitzer, *Plant Sci.* 66: 221-230, 1990) und enthält den 35S-

115

- Promotor des CaMV (Blumenkohlmosaikvirus) (Franck et al., 1980) das Terminations-signal des Octopin-Synthase Gens (Gielen et al., EMBO J. 3: 835-846, 1984) und die Sequenz kodierend für das Transitpeptid der *A.thaliana* plastiden-spezifischen Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2 (IPP-2) (Badur, unveröffentlicht). Die unter Berücksichtigung des korrekten Leserasters erfolgte Klonierung der Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* in diesen Vektor, erzeugt eine Translationsfusion der Tyrosin-Aminotransferase mit dem plastidären Transitpeptid. Dadurch erfolgt ein
- 10 Transport des Transgens in die Plastiden.
- Zur Erstellung dieses Plasmides wurde das Tyrosin-Aminotransferase-Gen unter Verwendung der flankierenden EcoRV Restriktionsschnittstellen aus dem Plasmid pGEM-T/Tyrosin-Aminotransferase isoliert. Dieses Fragment wurde unter Anwendung von Standardme-
- 15 thoden in einen SmaI geschnittenen pBinAR-IPP-Tp-10 ligiert (siehe Abbildung 61) Dieses Plasmid pBinAR-IPP-Tp-10/Tyrosin-Aminotransferase (oder auch pBinAr-35sP-IPP-RnTATase-nost bezeichnet) wurde zur Erzeugung transgener *Nicotiana tabacum* und *A.thaliana* Pflanzen verwendet.
- 20
- Fragment A (529 bp) in Abbildung 61 beinhaltet den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Blumenkohlmosaikvirus), Fragment B (207bp) kodiert für das Transitpeptid der Isopentenyl-pyrophosphat Isomerase-2, Fragment C (1377
- 25 Bp) kodiert für das Tyrosin-Aminotransferase-Gen-1 aus *Rattus norvegicus*, Fragment D (208Bp) kodiert für das Terminationssignal des Octopin-Synthase Gens.

Beispiel 74

- 30 Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

- Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Columbia) werden mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm (GV3101 [pMP90]) auf Grundlage einer modifizierten Vacuuminfiltrationsmethode transformiert
- 35 (Steve Clough und Andrew Bent. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *A.thaliana*. Plant J 16(6):735-43, 1998; der Bechtold, N. Ellis, J. und Pelltier, G., in: *Planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana* plants. CRe Acad Sci Paris, 1993,
- 40 1144(2):204-212). Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen werden im Vorfeld mit den vorstehend beschriebenen DNA Konstrukten transformiert.

- Samen der Primärtransformanten werden auf Grundlage der Antibio-
- 45 tikaresistenz selektioniert. Antibiotika resistente Keimlinge

wurden in Erde gepflanzt und als vollentwickelte Pflanzen zur biochemischen Analyse verwendet.

Beispiel 75

5 Herstellung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen.

Zehn ml YEB-Medium mit Antibiotikum (5 g/l Rinder-Extrakt, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose und 2 mM $MgSO_4$.) werden mit einer Kolonie von *Agrobacterium tumefaciens* beimpft und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Zellen werden 20 min bei 4°C, 3500 U/min in einer Tischzentrifuge pelletiert und danach in frischem YEB-Medium ohne Antibiotika unter sterilen Bedingungen resuspendiert. Die Zellsuspension wird für die Transformation eingesetzt.

15

Die Wildtyp-Pflanzen aus Sterilkultur werden durch vegetative Replikation erhalten. Dazu wird nur die Spitze der Pflanze abgeschnitten und auf frisches 2MS-Medium in ein steriles Einweckglas überführt. Vom Rest der Pflanze werden die Haare auf der Blattoberseite und die Mittelrippen der Blätter entfernt. Die Blätter werden mit einer Rasierklinge in etwa 1cm² große Stücke geschnitten. Die Agrobakterienkultur wird in eine kleine Petrischale überführt (Durchmesser 2 cm). Die Blattstücke werden kurz durch diese Lösung gezogen und mit der Blattunterseite auf 2MS-Medium in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gelegt, so daß sie das Medium berühren. Nach zwei Tagen im Dunkeln bei 25°C werden die Explantate auf Platten mit Kallusinduktionsmedium überführt und in der Klimakammer auf 28°C temperiert. Das Medium muß alle 7-10 Tage gewechselt werden. Sobald sich Kalli bilden, wurden die Explantate in sterile Einweckgläser auf Sproßinduktionsmedium mit Claforan (0,6 % BiTec-Agar (g/v), 2,0 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Naphtyllessigsäure, 0,02 mg/l Gibberelinsäure, 0,25 g/ml Claforan, 1,6 % Glukose (g/v) und 50 mg/l Kanamycin) überführt. Nach etwa einem Monat tritt Organogenese ein und die gebildeten Sprosse können abgeschnitten werden. Die Kultivierung der Sprosse wird auf 2MS-Medium mit Claforan und Selektionsmarker durchgeführt. Sobald sich ein kräftiger Wurzelballen bildet, können die Pflanzen in Pikiererde getopft werden.

40

Beispiel 76

Herstellung transgener *Brassica napus* Pflanzen.

Die Herstellung transgener Raps Pflanzen orientiert sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual,

Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer angegeben ist.

Die Transformationen erfolgt mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 [pMP90]. Zur Transformation wird das DNA Konstrukt welches eine spezifische Expression in Samen vermittelt verwendet (Abbildung 60). Darüberhinaus werden Konstrukt welche eine spezifische Expression in Samen vermittelt verwendet, die in den Abbildungen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 beschrieben sind. Samen von *Brassica napus* var. Westar werden mit 70% Ethanol (v/v) oberflächensteril gemacht, 10 Minuten bei 55°C in Wasser gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 Minuten inkubiert und sechsmal mit sterilem Wasser für jeweils 20 Minuten gewaschen. Die Samen werden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glaskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) werden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explantate werden 30 Minuten mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einem 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallusinduktionsmedium werden die Kulturen für 24 Stunden bei 100 U/min inkubiert.

Vom *Agrobacterium* Stamm wird eine Übernachtskultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20mg/l) angesetzt, davon 2ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 Stunden bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wird das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wird durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wird das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml *Agrobacterium*-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die *Agrobacterien*-Suspension wird entfernt, die Raps-Explantate für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wird für 24 h auf einem Rotationschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wird durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min

gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wird in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

Zur Regeneration werden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthalten. Die Petrischalen werden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25 °C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/ 8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage werden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium umgesetzt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen werden wie von Bade, J.B und Damm, B. (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

15 Beispiel 77

a) Charakterisierung der transgenen *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* Pflanzen.

Die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in Blätter und Samen der mit den beschriebenen Konstrukten transformierten Pflanzen (*Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum*) werden analysiert. Dazu werden die transgenen Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und Pflanzen die das Gen kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase-1 aus *Rattus norvegicus* exprimieren auf Northern-Ebene analysiert. In Blättern und Samen dieser Pflanzen wird der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt ermittelt.

Dazu wird das Blattmaterial von Pflanzen direkt nach der Probennahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Der anschließende Aufschluß der Zellen erfolgt mittels einer Rührapparatur durch dreimalige Inkubation im Eppendorfschüttler bei 30°C, 1000 rpm in 100 % Methanol für 15 Minuten, wobei die jeweils erhaltenen Überstände vereinigt wurden.

Weitere Inkubationsschritte ergaben keine weitere Freisetzung von Tocopherolen oder Tocotrienolen.

Um Oxidation zu vermeiden, wurden die erhaltenen Extrakte direkt nach der Extraktion mit Hilfe einer HPLC-Anlage (Waters Alliance 2690) analysiert. Tocopherole und Tocotrienole wurden über eine reverse Phase Säule (ProntoSil 200-3-C30^(R), Fa. Bischoff) mit einer mobilen Phase von 100 % Methanol getrennt und anhand von Standards (Fa. Merck) identifiziert. Als Detektionssystem diente die Fluoreszenz der Substanzen (Anregung 295 nm, Emission 320 nm) die mit Hilfe eines Jasco Fluoreszenzdetektors FP 920 nachgewiesen wurde.

In allen Fällen war die Tocopherol- und oder Tocotrienol-Konzentration in transgenen Pflanzen, im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen erhöht.

5 b) Charakterisierung der transgenen *Brassica napus* Pflanzen.

- Um zu veranschaulichen, daß durch die Expression des Tyrosin-Aminotransferase-Gens aus *Rattus norvegicus*, Tyrosin-Aminotransferase-Gens 1 aus *Arabidopsis thaliana*, Tyrosin-Aminotransferase-Gens 3 aus *Arabidopsis thaliana*, Tyrosin-Aminotransferase-Gens 5 aus *Arabidopsis thaliana* oder Tyrosin-Aminotransferase-Gens 6 aus *Arabidopsis thaliana* alleine oder in Kombination mit zumindest einem weiteren Gen ausgewählt aus der Gruppe Hydroxyphenyl-Pyruvat-Dioxygenase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Homogentisinsäure-Phenyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana*, Geranylgeranylpyrophosphat-Oxidoreduktase-Gen aus *Nicotiana tabacum*, 2-Methyl-6-Phenylhydrochinon-Methyltransferase-Gen aus *Synechocystis* sp. PCC6803, 2,3-Dimethyl-5-Phenylplastoquinol-Zyklase-Gen *Synechocystis* sp. PCC6803, γ -Tocopherol-methyltransferase-Gen aus *Arabidopsis thaliana* und der Unterdrückung der Expression des Homogentisinsäure-Dioxygenase-Gens, der Vitamin E-gehalt in Pflanzen erhöht wird, werden die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in den Samen der mit den beschriebenen Konstrukten transformierten Pflanzen (*Brassica napus*) analysiert.

25 Dazu werden die transgenen Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und auf Northern-Ebene analysiert. In Samen dieser Pflanzen wird der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt analog Beispiel 77 a) ermittelt.

30

Beispiel 78

Herstellung transgener *Arabidopsis thaliana* Pflanzen, die die Tyrosinaminotransferase überexprimieren

- 35 Wildtyp *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (Columbia) wurden mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm (GV3101 [pMP90]) auf Grundlage einer modifizierten Vakuuminfiltrationsmethode transformiert (Steve Clough und Andrew Bent. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *A. thaliana*. Plant J 16(6):735-43, 1998; der Bechtold, N. Ellis, J. und Pelletier, G., in: *Planta Agrobacterium-mediated gene transfer by infiltration of adult Arabidopsis thaliana* plants. CR Acad Sci Paris, 1993, 1144(2):204-212).

- 45 Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen waren im Vorfeld mit den Plasmiden pBinAR-35s-IPP-RnTatase-nost (Beispiel 73, Abbildung 61) und pPTVkan-LeB4-IPP-RnTATase-nost (Beispiel 72, Ab-

bildung 60) gemäß der von R. HÖFGEN und L. WILLMITZER (Plant Sci. 1990, 66, 221-230 und Nucleic Acids Res. 1988, Oct 25, 16(20), 9877) beschriebenen Methode transformiert worden.

- 5 Samen der Primärtransformanten wurden auf Grundlage der Antibiotikaresistenz selektioniert. Antibiotika resistente Keimlinge wurden in Erde gepflanzt und als vollentwickelte Pflanzen zur biochemischen Analyse verwendet.

10 Beispiel 79

Herstellung transgener *Brassica napus* Pflanzen, die die Tyrosinaminotransferase überexprimieren

- Die Herstellung transgener Raps Pflanzen orientierte sich an
15 einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzung der verwendeten Medien und Puffer angegeben ist.

- 20 Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 [pMP90]. Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen waren im Vorfeld mit dem Plasmid pPTVkan-LeB4-IPP-RnTA-Tase-nost (Beispiel 72, Abbildung 60) gemäß der von R. HÖFGEN und L. WILLMITZER (Plant Sci. 1990, 66, 221-230 und Nucleic Acids
25 Res. 1988, Oct 25, 16(20), 9877) beschriebenen Methode transformiert worden.

- Samen von *Brassica napus* var. Westar wurden mit 70% Ethanol (v/v) oberflächensteril gemacht, 10 Minuten bei 55°C in Wasser ge-
30 waschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25 % v/v Teepol, 0,1 % v/v Tween 20) für 20 Minuten inkubiert und sechsmal mit sterilem Wasser für jeweils 20 Minuten gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glaskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von
35 mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explantate wurden 30 Minuten mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einem 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallusinduktions-
40 medium wurden die Kulturen für 24 Stunden bei 100 U/min inkubiert.

- Vom *Agrobacterium* Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20mg/l) angesetzt, davon 2ml in
45 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 Stunden bei 29°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml

121

Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,3 eingestellt.

- 5 Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobakterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobakterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend
- 10 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Wasch-
- 15 medium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

- Zur Regeneration wurden jeweils 20 bis 30 Explante in 90 mm
- 20 Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit
- 25 Sproß-Induktionsmedium umgesetzt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurden wie von Bade, J.B und Damm, B. (in: Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

30

Beispiel 80

Herstellung transgener *Nicotiana tabacum* Pflanzen, die die Tyrosinaminotransferase überexprimieren

- 35 Zehn ml YEB-Medium mit Antibiotikum (5 g/l Rinder-Extrakt, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Pepton, 5 g/l Saccharose und 2 mM MgSO₄.) wurden mit einer Kolonie von *Agrobacterium tumefaciens* beimpft und über Nacht bei 28°C kultiviert. Die Zellen wurden 20 min bei 4°C, 3500 U/min in einer Tischzentrifuge pelletiert und danach in
- 40 frischem YEB-Medium ohne Antibiotika unter sterilen Bedingungen resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für die Transformation eingesetzt.

- Die verwendeten *Agrobacterium tumefaciens* Zellen waren im Vorfeld
- 45 mit dem Plasmid pBinAR-35s-IPP-RnTatase-nosT (Beispiel 73, Abbildung 61) gemäß der von R. HÖFGEN und L. WILLMITZER (Plant Sci.

122

1990, 66, 221-230 und Nucleic Acids Res. 1988, Oct 25, 16(20), 9877) beschriebenen Methode transformiert worden.

Die Wildtyp-Pflanzen aus Sterilkultur wurden durch vegetative
5 Replikation erhalten. Dazu wurde nur die Spitze der Pflanze abgeschnitten und auf frisches 2MS-Medium in ein steriles Einweckglas überführt. Vom Rest der Pflanze wurden die Haare auf der Blattoberseite und die Mittelrippen der Blätter entfernt. Die Blätter wurden mit einer Rasierklinge in etwa 1cm² große Stücke
10 geschnitten. Die Agrobakterienkultur wurde in eine kleine Petrischale überführt (Durchmesser 2 cm). Die Blattstücke wurden kurz durch diese Lösung gezogen und mit der Blattunterseite auf 2MS-Medium in Petrischalen (Durchmesser 9 cm) gelegt, so daß sie das Medium berührten.

15

Nach zwei Tagen im Dunkeln bei 25°C wurden die Explantate auf Platten mit Kallusinduktionsmedium überführt und in der Klimakammer auf 28°C temperiert. Das Medium mußte alle 7 bis 10 Tage gewechselt werden. Sobald sich Kalli bildeten, wurden die
20 Explantate in sterile Einweckgläser auf Sproßinduktionsmedium mit Claforan (0,6 % BiTec-Agar (g/v), 2,0 mg/l Zeatinribose, 0,02 mg/l Naphthyllessigsäure, 0,02 mg/l Gibberelinsäure, 0,25 g/ml Claforan, 1,6 % Glukose (g/v) und 50 mg/l Kanamycin) überführt. Nach etwa einem Monat trat Organogenese ein und die
25 gebildeten Sprosse konnten abgeschnitten werden.

Die Kultivierung der Sprosse wurde auf 2MS-Medium mit Claforan und Selektionsmarker durchgeführt. Sobald sich ein kräftiger Wurzelballen gebildet hatte, konnten die Pflanzen in Pikiererde
30 getopft werden.

Beispiel 81

Charakterisierung der transgenen Pflanzen aus Beispiel 78, 79 und 80

35

Die Tocopherol- und Tocotrienol-Gehalte in Blätter und Samen der mit den beschriebenen Konstrukten transformierten Pflanzen aus Beispiel 78, 79 und 80 (*Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus* und *Nicotiana tabacum*) werden analysiert. Dazu wurden die transgenen
40 Pflanzen im Gewächshaus kultiviert und Pflanzen die das Gen kodierend für die Tyrosin-Aminotransferase aus *Rattus norvegicus* exprimieren auf Northern-Ebene analysiert. In Blättern und Samen dieser Pflanzen wurde der Tocopherolgehalt und der Tocotrienolgehalt ermittelt.

45

123

Dazu wird das Blattmaterial von Pflanzen direkt nach der Probennahme in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Der daran anschließende Aufschluß der Zellen erfolgt mittels einer Rührapparatur durch dreimalige Inkubation im Eppendorfschüttler bei 5 30°C, 1000 rpm in 100 % Methanol für 15 Minuten, wobei die jeweils erhaltenen Überstände vereinigt wurden.

Weitere Inkubationsschritte ergaben keine weitere Freisetzung von Tocopherolen oder Tocotrienolen.

10

Um Oxidation zu vermeiden, wurden die erhaltenen Extrakte direkt nach der Extraktion mit Hilfe einer HPLC-Anlage (Waters Alliance 2690) analysiert. Tocopherole und Tocotrienole wurden über eine reverse Phase Säule (ProntoSil 200-3-C30^(R), Fa. Bischoff) mit einer mobilen Phase von 100 % Methanol getrennt und anhand von 15 Standards (Fa. Merck) identifiziert. Als Detektionssystem diente die Fluoreszenz der Substanzen (Anregung 295 nm, Emission 320 nm) die mit Hilfe eines Jasco Fluoreszenzdetektors FP 920 nachgewiesen wurde.

20

Tabelle 1 zeigt das Ergebnis der Überexpression der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* in 16 Linien (Linie 1 bis 24) der transgenen *Nicotiana tabacum*, hergestellt nach Beispiel 80 im Vergleich zum Wildtyp (WT, 4 Replikanten). Dargestellt in der 25 zweiten Spalte ist der Gehalt an Vitamin E (Gesamtgehalt = Summe aller 8 Isomere) in jungem Blattmaterial in [$\mu\text{g/gFW}$]. In der dritten Spalte ist der Tocotrienol-Anteil der jeweiligen Linie am Gesamtgehalt Vitamin E in [Gew.-%] angegeben.

30 Tabelle 1

35	Linie transgener <i>Nicotiana tabacum</i> -Pflanzen aus Beispiel 80	Gesamtgehalt Vitamin E in [$\mu\text{g/gFW}$]	Anteil Tocotrienole in [Gew.-%] bezogen auf den Gesamtgehalt
	1	9,13	48,5
	2	2,95	4,6
	3	5,94	49,5
	4	7,24	5,8
	6	5,97	7,6
40	7	8,02	6,4
	9	16,26	53,1
	10	8,95	41,3
	11	13,28	51,6
	16	8,96	42,9
	17	3,99	3,2
45	18	10,58	51,7
	19	7,57	41,3
	24	14,76	56,7
	WT n=4	5,4 +/- 0,5	4,75 +/- 2,4

124

Abbildung 63 zeigt grafisch das Ergebnis der Überexpression der Tyrosinaminotransferase aus *Rattus norvegicus* in *Nicotiana tabacum* (Beispiel 80) im Vergleich zum Wildtyp. Dargestellt sind die Gehalte an Vitamin E (Summe aller 8 Isomere) in jungem 5 Blattmaterial. Die Achsenbeschriftung kennzeichnet die einzelnen transgenen Linien. Die dargestellten Werte bei den Wildtyp-pflanzen (wt) entsprechen dem Mittelwert +/- SD von 4 Replikaten.

10

15

20

25

30

35

40

45

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Vitamin E durch Kultivierung
5 von Organismen die gegenüber dem Wildtyp eine erhöhte Tyrosinaminotransferase-Aktivität aufweisen.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man
zur Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität die Genex-
10 pression einer Nukleinsäure kodierend eine Tyrosinaminotrans-
ferase gegenüber dem Wildtyp erhöht.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man
zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren codierend eine
15 Tyrosinaminotransferase, in den Organismus einbringt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß man
Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend
die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Se-
20 quenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Amino-
säuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens
20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und
die die enzymatische Eigenschaft einer Tyrosinaminotransfe-
rase aufweisen.
25
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man
eine Nukleinsäure, enthaltend die Sequenz SEQ. ID. NO. 1 ein-
bringt.
- 30 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Organismen zusätzlich gegenüber dem Wildtyp
eine erhöhte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, aus-
gewählt aus der Gruppe Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Akti-
vität, Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, Geranyl-Ger-
35 anyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, 2-Me-
thyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, Toco-
pherolcyclase-Aktivität und γ -Tocopherol-Methyltransferase-
Aktivität aufweisen.
- 40 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß man
zur zusätzlichen Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten,
die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure ausgewählt
aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpy-
ruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-
45 Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Ger-
anyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine
2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren

kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase gegenüber dem Wildtyp erhöht.

- 5 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression mindestens einer der Nukleinsäuren, mindestens eine Nukleinsäure ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phy-
10 tyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase in den Organismus ein-
15 bringt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen gegenüber dem Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität und Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität aufweisen.
- 20 10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man zur zusätzlichen Reduzierung mindestens einer der Aktivitäten, die Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoacetat-Isomerase und Nukleinsäuren kodierend eine Fumarylacetoacetat-Hydrolase gegenüber dem Wildtyp reduziert.
- 25 30 11. Verfahren gemäß Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Organismen eine reduzierte Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität aufweisen.
- 35 12. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß man in den Organismus eine RNA einbringt, die einen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil der Organismus eigenen Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxy-
40 genase identisch ist.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus eine Pflanze verwendet.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß man nach dem Kultivieren den Organismus erntet und die Vitamin-E-Verbindungen anschließend aus dem Organismus isoliert.
- 5
15. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
- 10
16. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren enthalten, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.
- 15
17. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 15 oder 16 dadurch gekennzeichnet, daß man als Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase ein Nukleinsäuren verwendet, die Proteine kodiert, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- 20
- eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer Tyrosinaminotransferase aufweist.
- 25
18. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß man Regulationssignale verwendet, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.
- 30
19. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 18, enthaltend zusätzlich eine Nukleinsäure kodierend ein plastidäres Transitpeptid.
- 35
20. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 15 bis 19, enthaltend zusätzlich eine, zwei oder drei Nukleinsäuren, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren
- 40
- kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die
- 45
- Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

21. Nukleinsäurekonstrukt nach einem der Ansprüche 15 bis 20,
enthaltend zusätzlich funktionell verknüpft eine RNA, die ei-
nen Bereich mit Doppel-Strang-Struktur aufweist und in diesem
Bereich eine Nukleinsäuresequenz aufweist, die mit einem Teil
5 einer Nukleinsäure, codierend eine Homogentisat-Dioxygenase
identisch ist.
22. Kombination aus Nukleinsäurekonstrukten, wobei die Kombina-
tion ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß einem der Ansprüche 15
10 bis 21 und
- a) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, ausgewählt
aus der Gruppe A bis F
- 15 A Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend
eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, die mit einem oder
mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind,
die die Transkription und Translation in Organismen ge-
währleisten,
- 20 B Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend
eine Homogentisat-Phytyltransferase, die mit einem oder
mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind,
die die Transkription und Translation in Organismen ge-
25 währleisten und
- C Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend
eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, die mit
einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell ver-
knüpft sind, die die Transkription und Translation in Or-
30 ganismen gewährleisten,
- D Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend
eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, die
mit einem oder mehreren Regulationssignalen funktionell
35 verknüpft sind, die die Transkription und Translation in
Organismen gewährleisten,
- E Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend
40 eine Tocopherolcyclase, die mit einem oder mehreren
Regulationssignalen funktionell verknüpft sind, die die
Transkription und Translation in Organismen gewährleisten
und
- 45 F Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend Nukleinsäuren codierend
eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, die mit einem oder
mehreren Regulationssignalen funktionell verknüpft sind,

die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten,

oder

5

b) mindestens ein weiteres Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend zwei, drei oder vier Nukleinsäurekonstrukte, ausgewählt aus der Gruppe der Nukleinsäurekonstrukte A bis F,

10

umfasst.

23. Kombination von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß die Regulationssignale einen oder mehrere Promotoren und einen oder mehrere Terminatoren enthalten, die die Transkription und Translation in Organismen gewährleisten.

15

24. Kombination von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß man Regulationssignale verwendet, die die Transkription und Translation in Pflanzen gewährleisten.

20

25. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Aktivität einer Tyrosinaminotransferase gegenüber einem Wildtyp erhöht.

25

26. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität durch eine Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.

30

27. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß man zur Erhöhung der Genexpression Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase, in den Organismus einbringt.

35

28. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren einbringt, die Proteine kodieren, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 20 % auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2, und die die enzymatische Eigenschaft einer Tyrosinaminotransferase aufweisen.

45

29. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus mindestens eine exogene Nukleinsäure codierend eine Tyrosinaminotransferase oder mindestens zwei endogene Nukleinsäuren codierend eine Tyrosinaminotransferase enthält.
30. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase-Aktivität, Homogentisat-Phytyltransferase-Aktivität, Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase-Aktivität, 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase-Aktivität, Tocopherolcyclase-Aktivität und γ -Tocopherol-Methyltransferase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp erhöht.
31. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Erhöhung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Erhöhung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe, Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
32. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß der Organismus mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Homogentisat-Phytyltransferase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat-Oxidoreduktase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine 2-Methyl-6-Phytylhydrochinon-Methyltransferase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine Tocopherolcyclase oder zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine Tocopherolcyclase und/oder mindestens eine exogene Nukleinsäure kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase oder

131

zwei oder mehr endogene Nukleinsäuren kodierend eine γ -Tocopherol-Methyltransferase, enthält.

33. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25
5 bis 32, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische Veränderung zusätzlich mindestens eine der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe, Homogentisat-Dioxygenase-Aktivität, Maleylacetoacetat-Isomerase-Aktivität und Fumarylacetoacetat-Hydrolase-Aktivität gegenüber einem Wildtyp reduziert.
- 10 34. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die Reduzierung mindestens einer der Aktivitäten durch eine Reduzierung der Genexpression mindestens einer Nukleinsäure, ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren
15 kodierend eine Homogentisat-Dioxygenase, Nukleinsäuren kodierend eine Maleylacetoacetat-Isomerase und Nukleinsäuren kodierend eine Fumarylacetoacetat-Hydrolase, gegenüber dem Wildtyp bewirkt wird.
- 20 35. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp einen erhöhten Vitamin E-Gehalt aufweist.
- 25 36. Genetisch veränderter Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 35, dadurch gekennzeichnet daß man als Organismus eine Pflanze verwendet.
- 30 37. Verwendung eines genetisch veränderten Organismus nach einem der Ansprüche 25 bis 36 zur Herstellung von Vitamin E.
38. Verwendung der genetisch veränderten Organismen nach einem der Ansprüche 25 bis 36 als Futter- und Nahrungsmittel, zur Herstellung von prozessierten Lebensmittel, zur Herstellung
35 von Vitamin E-haltigen Extrakten der Organismen oder zur Herstellung von Futter- und Nahrungsergänzungsmittel.
39. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen gemäß einem der Ansprüche 25 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß man Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12
40 oder Nukleinsäurekonstrukte gemäß einem der Ansprüche 15 bis 21 oder Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24 in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.

40. Verwendung der Nukleinsäuren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12 oder der Nukleinsäurekonstrukte gemäß einem der Ansprüche 15 bis 21 oder der Kombinationen von Nukleinsäurekonstrukten gemäß einem der Ansprüche 22 bis 24 zur Erhöhung des Gehalts an Vitamin E in Organismen, die als Wildtyp in der Lage sind, Vitamin E zu produzieren.

10

15

20

25

30

35

40

45

Abbildung 1:

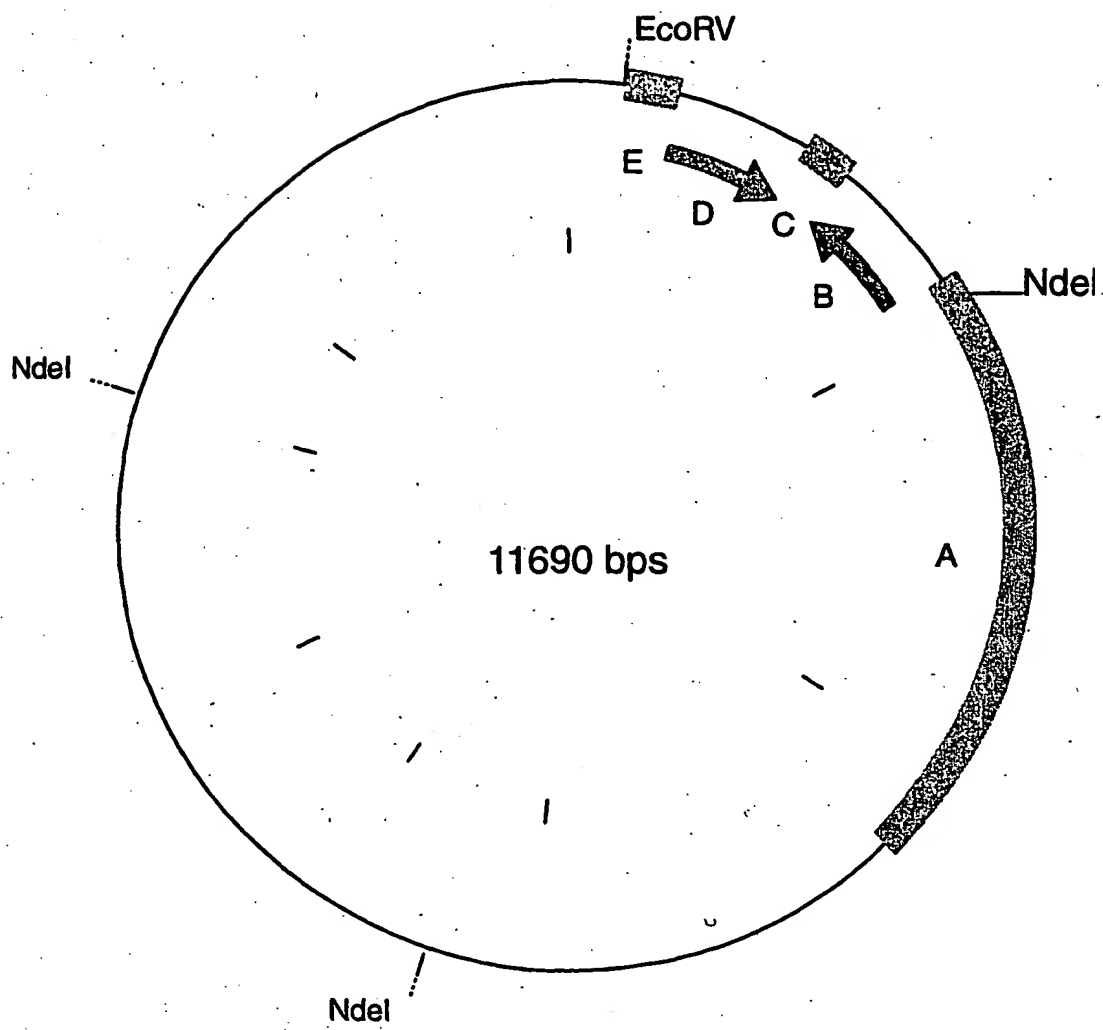
pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst

Abbildung 2:

pSUN2-USPP-rbcS-RnTATase-nost

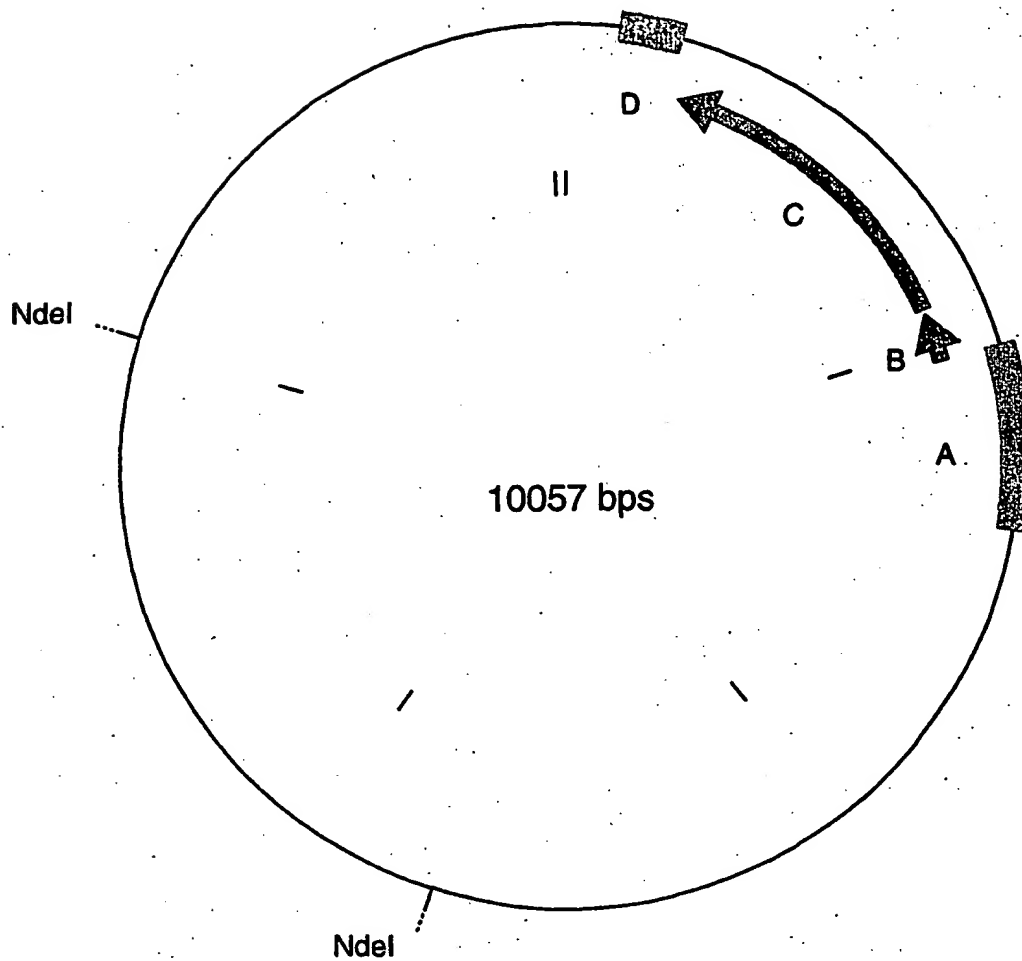


Abbildung 3:

pSUN2-USPP-AtTATase1-nosT

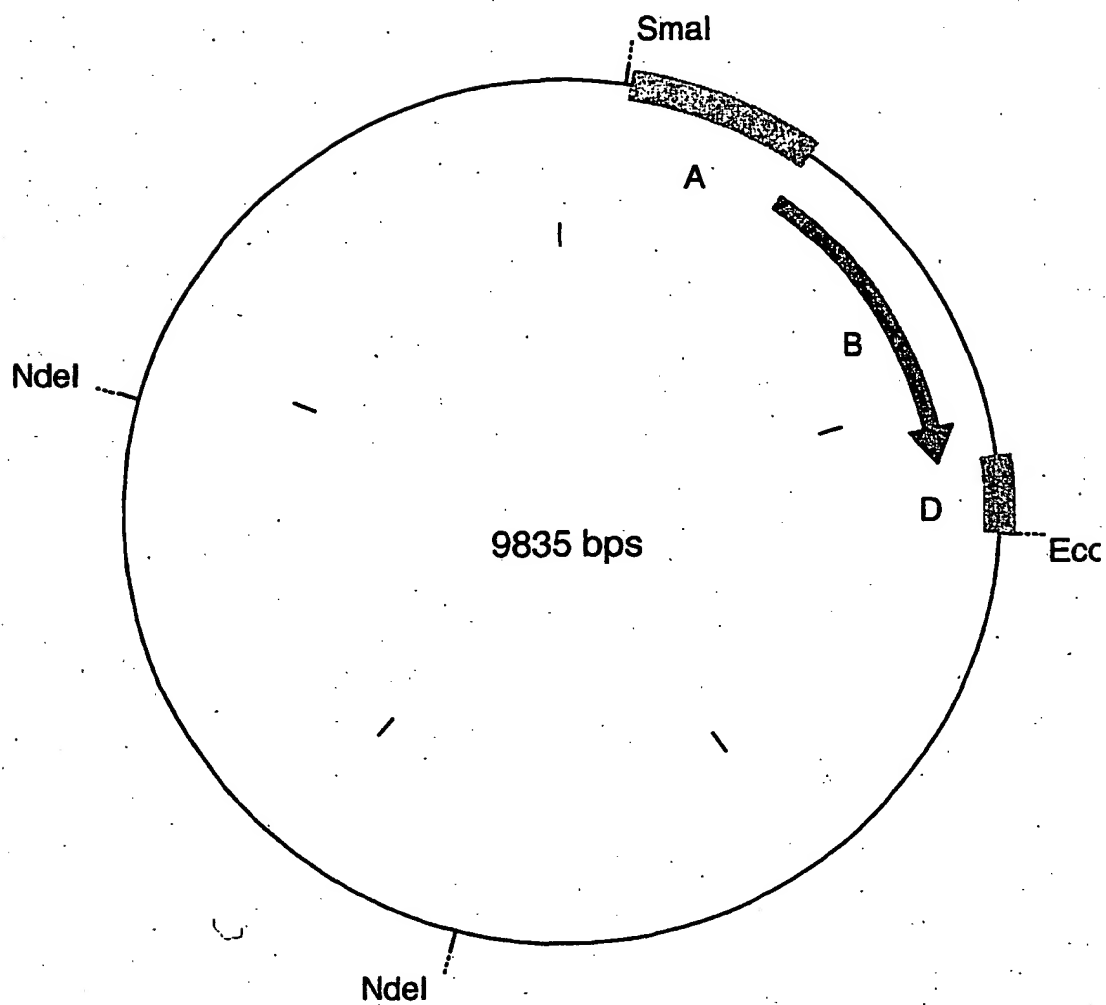


Abbildung 4:

pSUN2-USPP-AtTATase3-nost

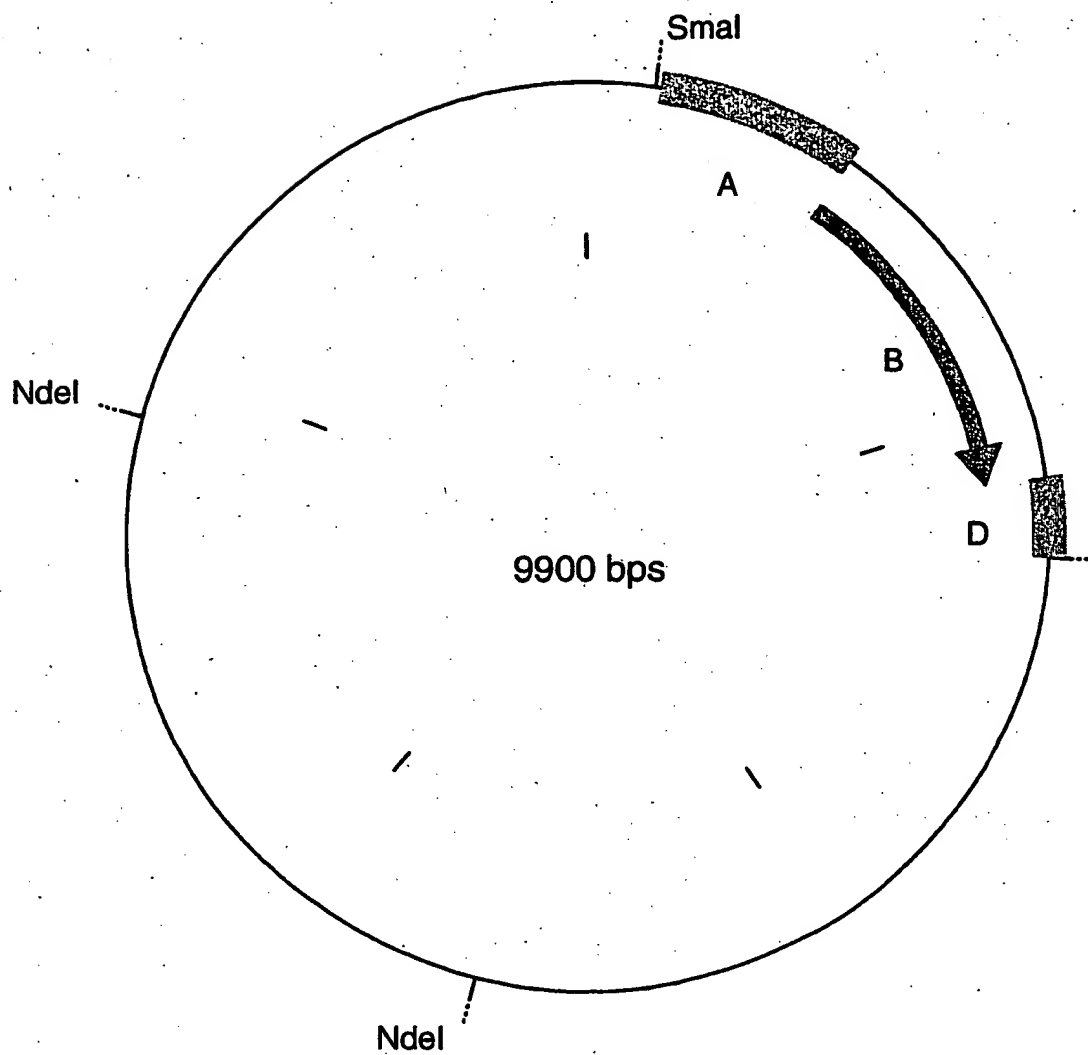


Abbildung 5:

pSUN2-USPP-AtTATase5-nost

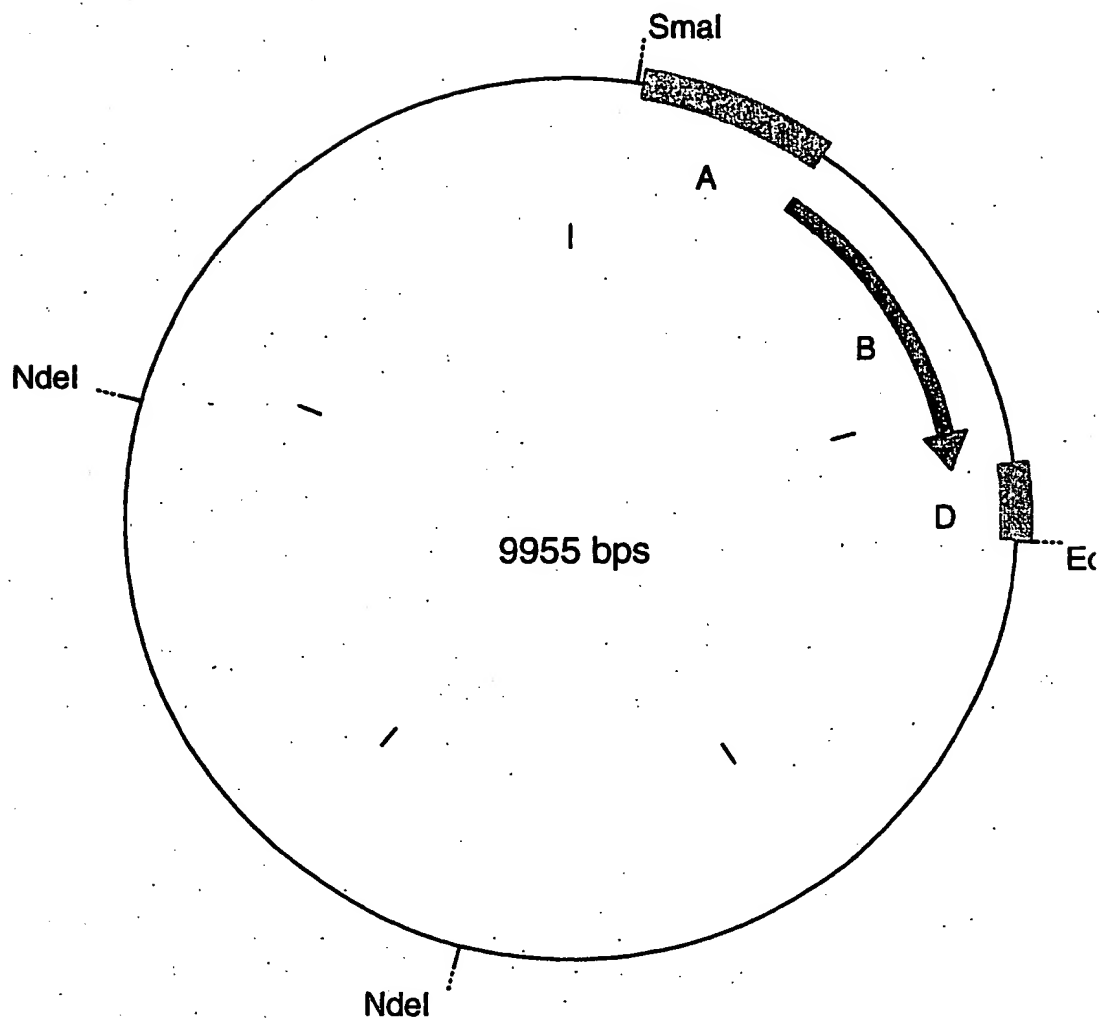
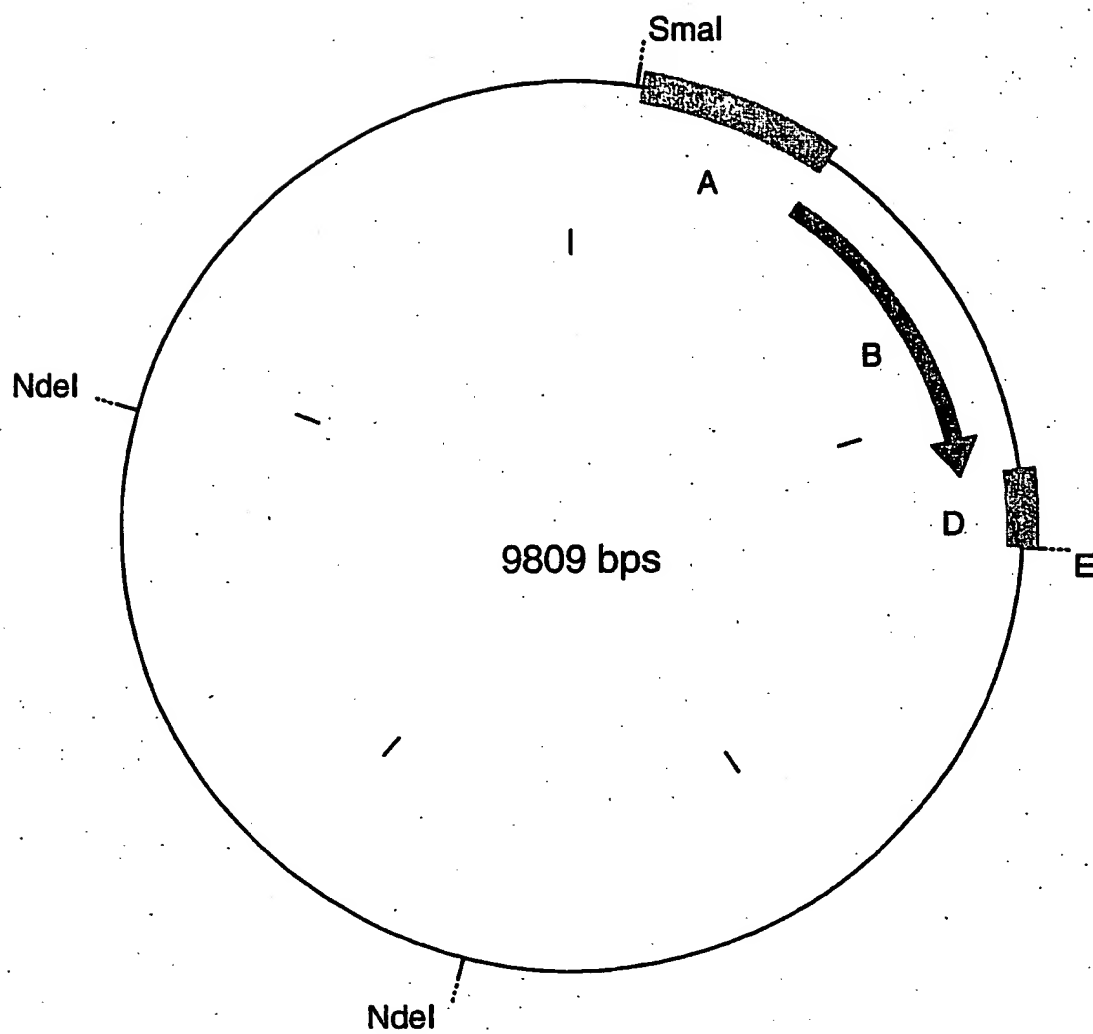


Abbildung 6:

pSUN2-USPP-AttTATase6-nost



7/63

Abbildung 7:

pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT

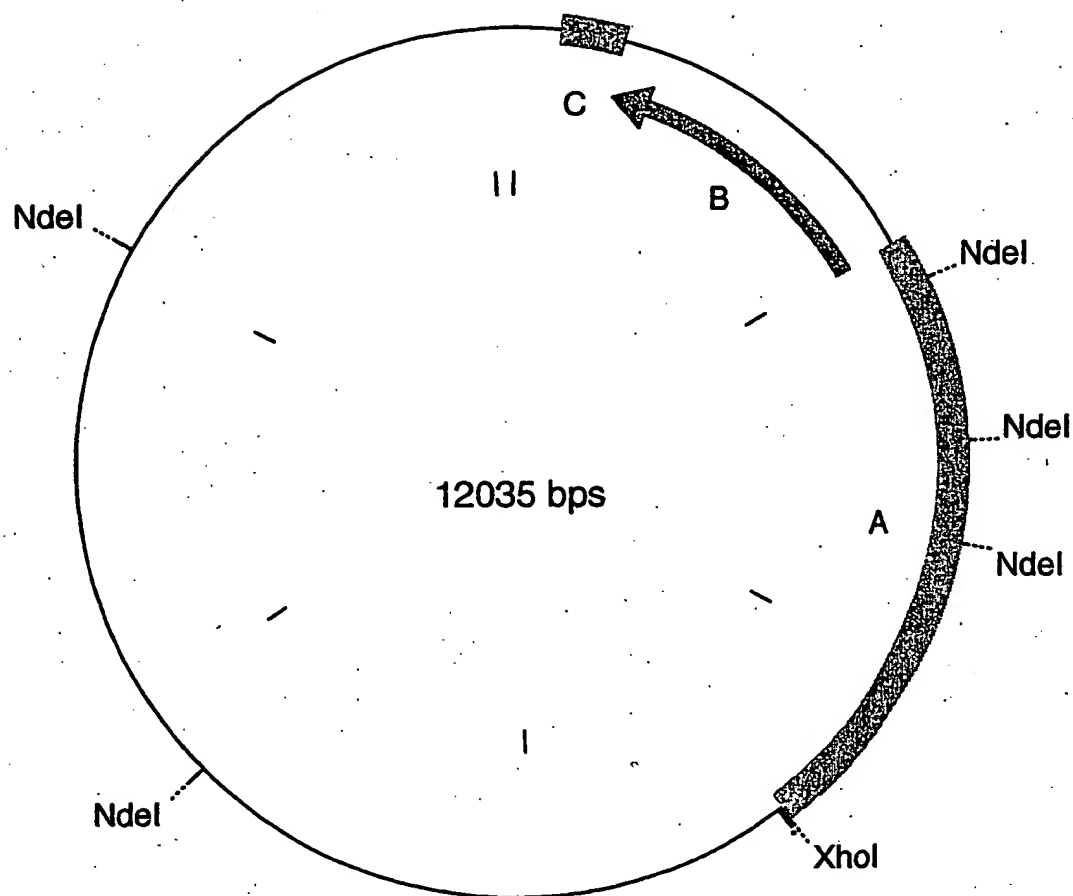
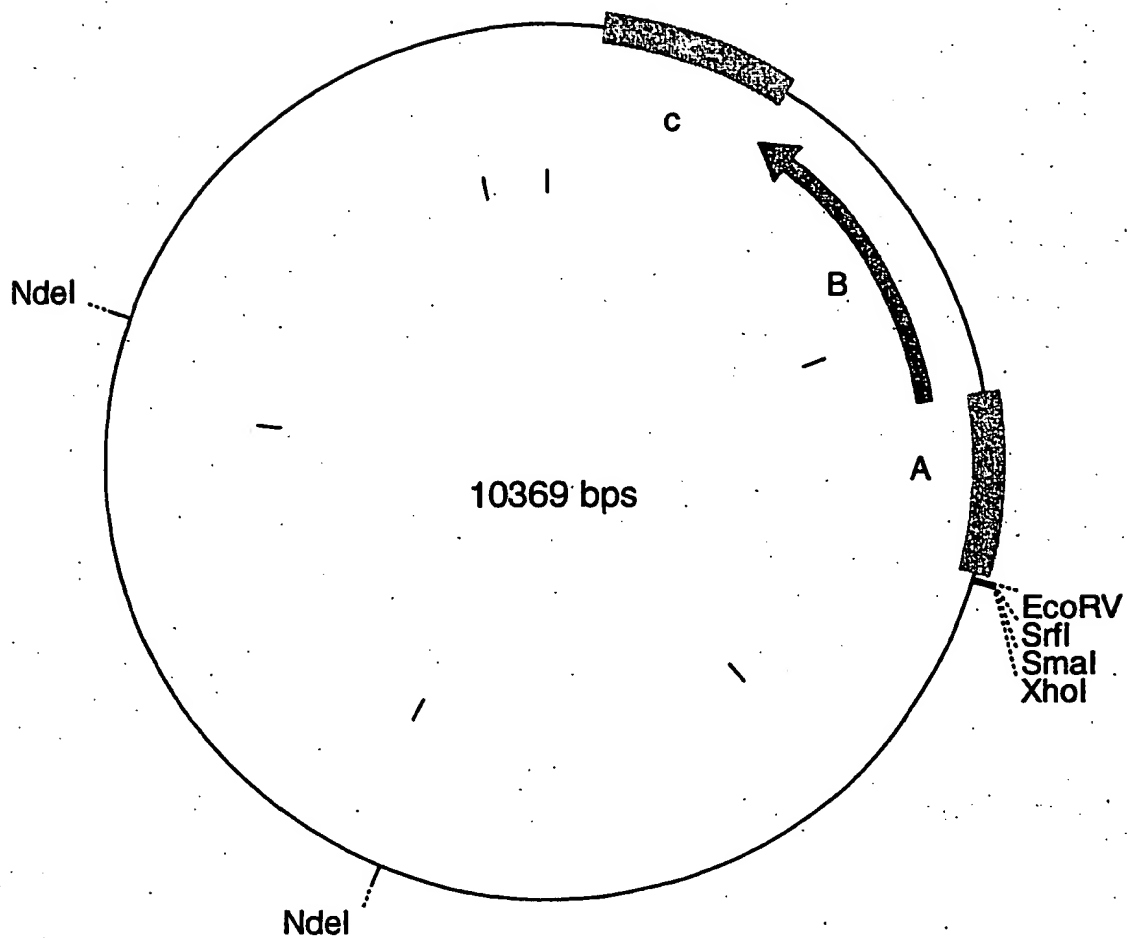


Abbildung 8:

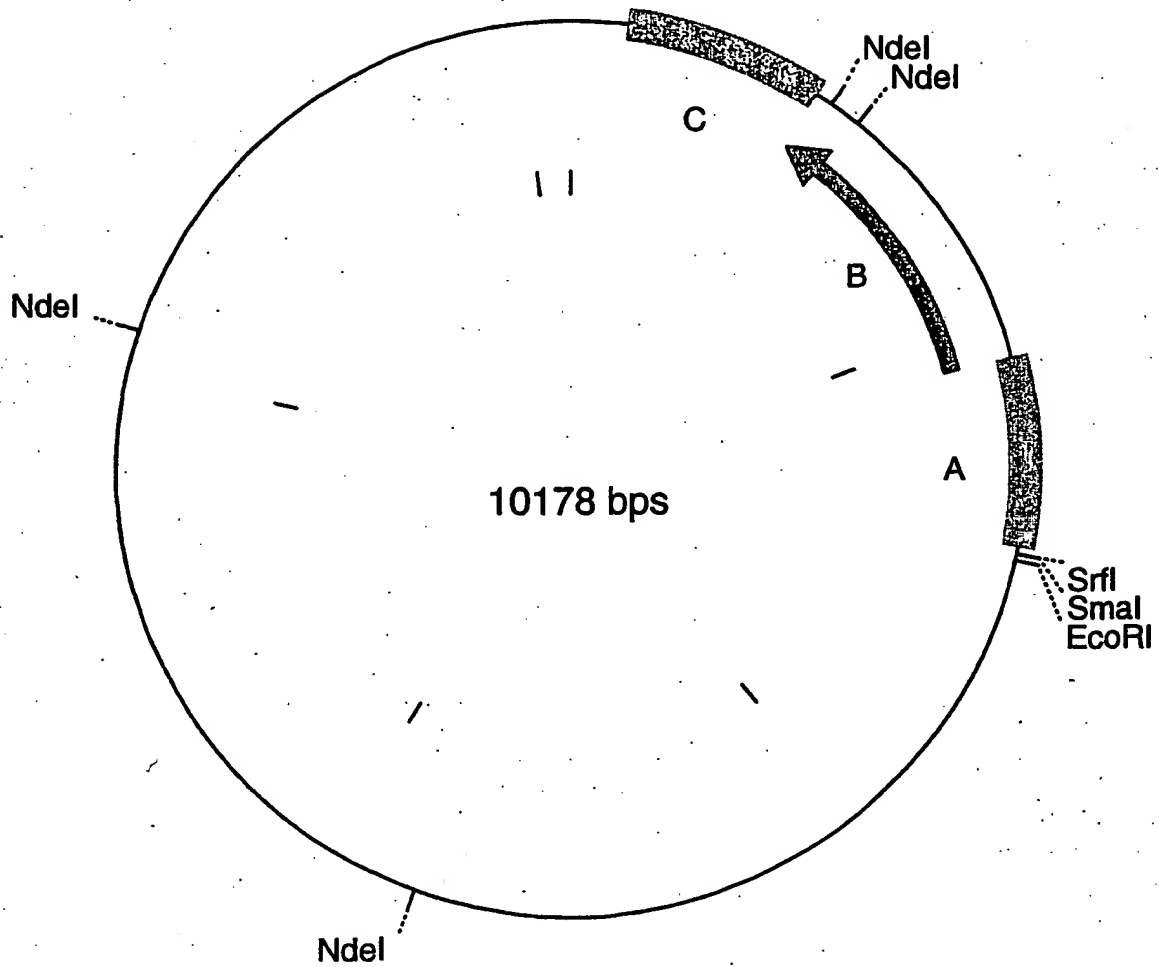
pSUN2-USP-AtHPPD-ocst



9/63

Abbildung 9:

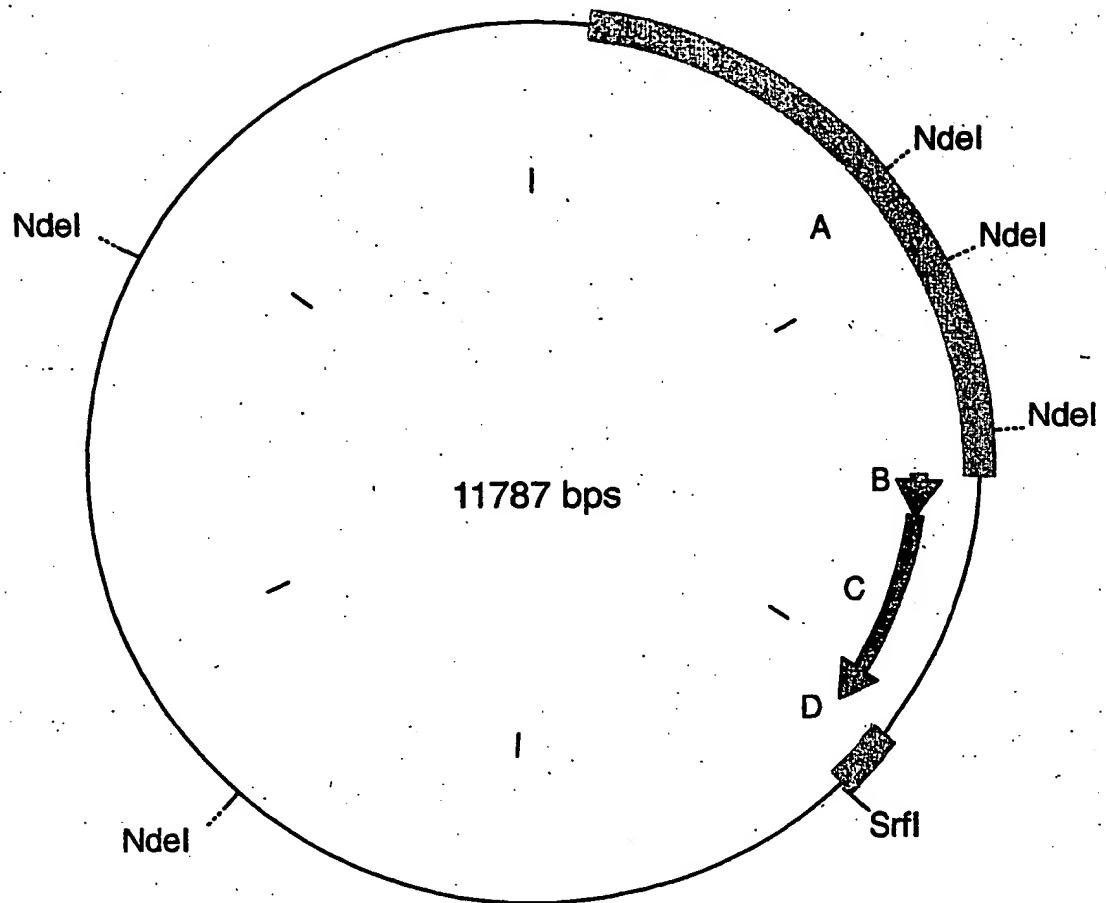
pSUN2-USP-AtHPT-ocst



10/63

Abbildung 10:

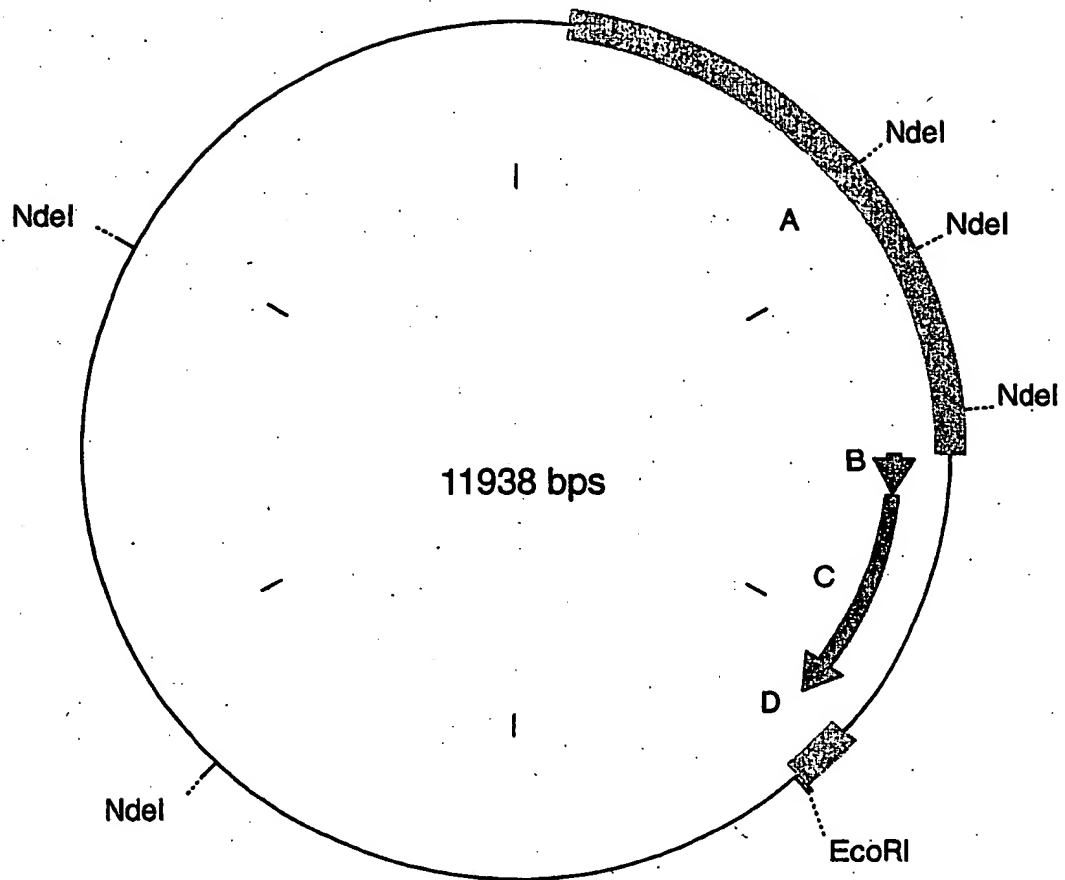
pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nosT



11/63

Abbildung 11:

pSUN2-LeB4-IPP-SynCyc-nost



12/63

Abbildung 12:

pSUN2-SBPP-AtγTMT-35sT

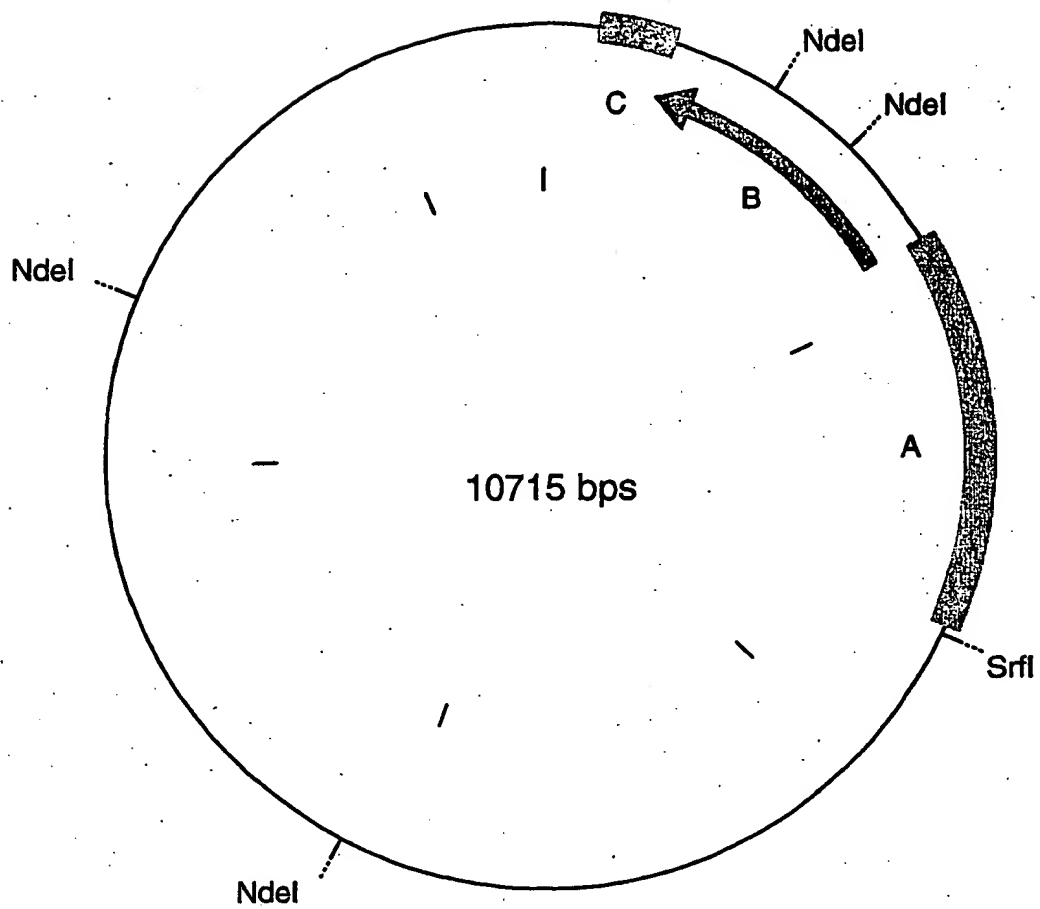


Abbildung 13:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-USPP-rbcS-RnTATase-nost

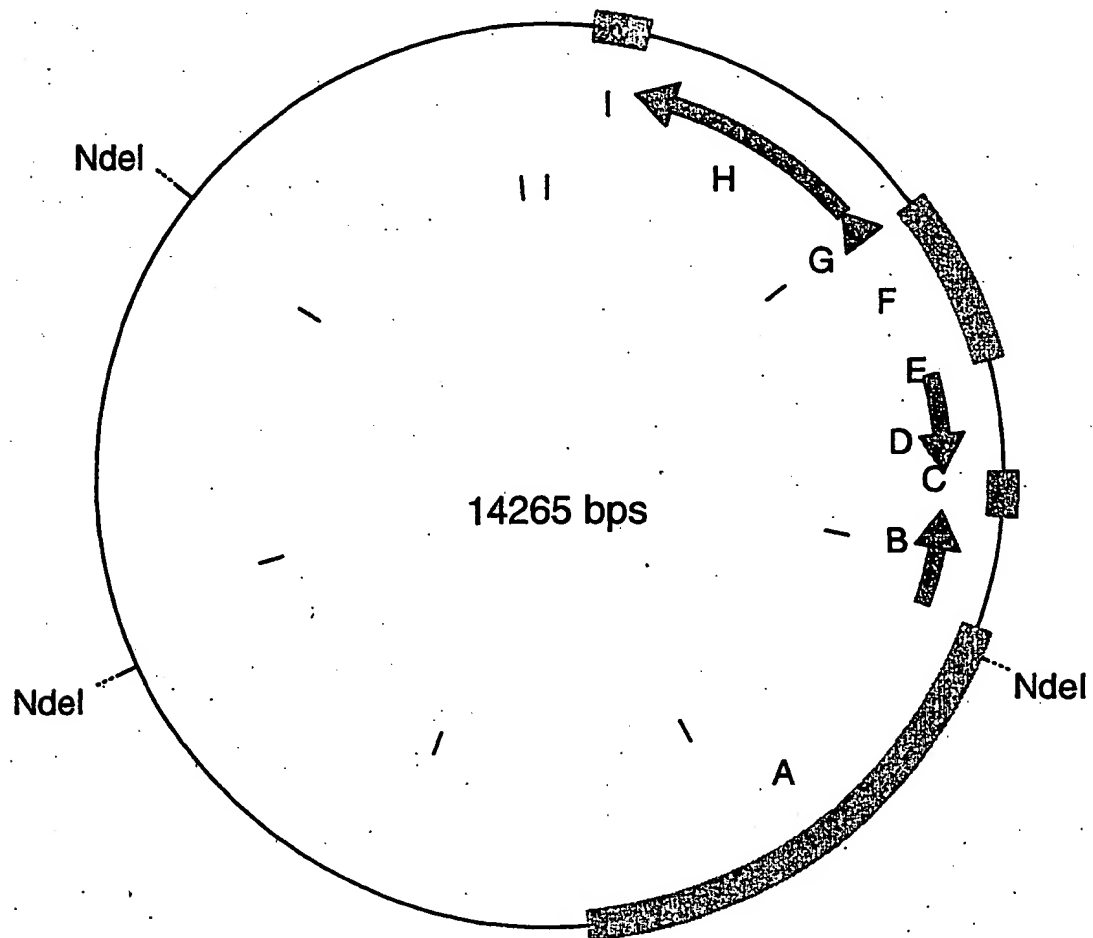


Abbildung 14:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-USPP-AtTATAse1-nost

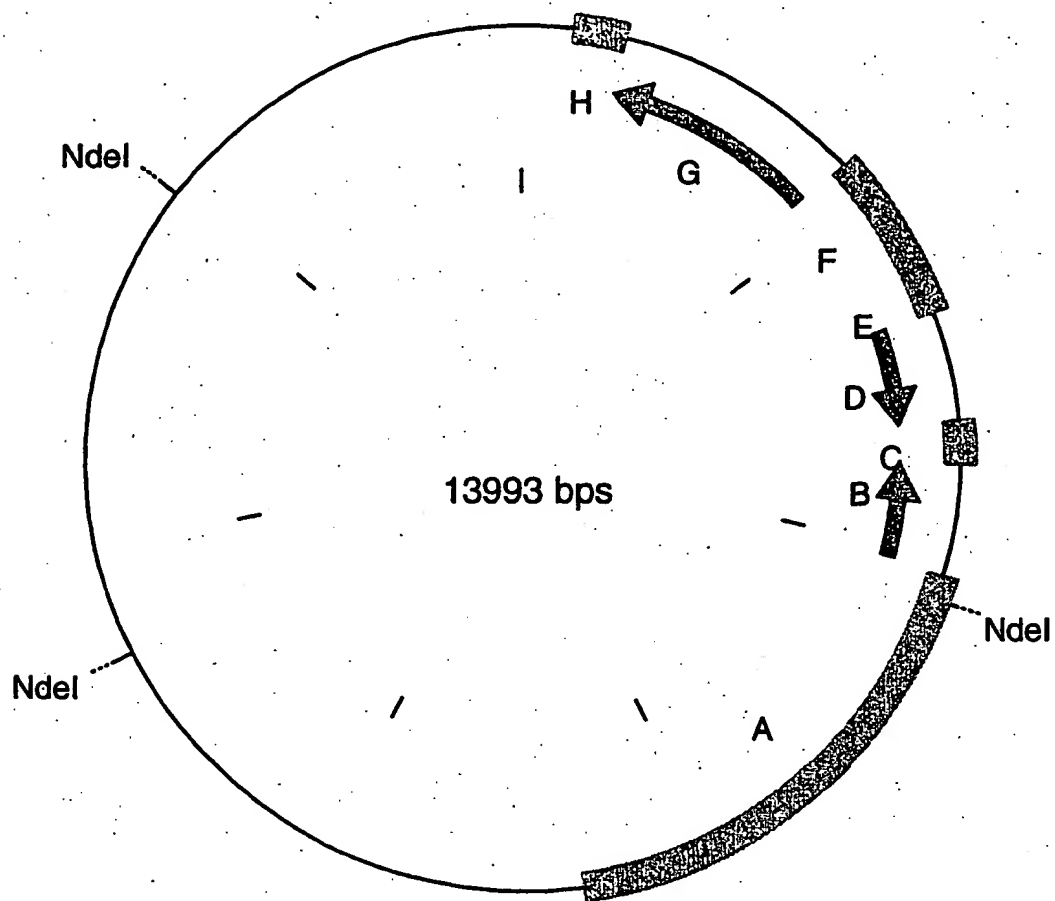


Abbildung 15:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst-USPP-AtTATase3-nost

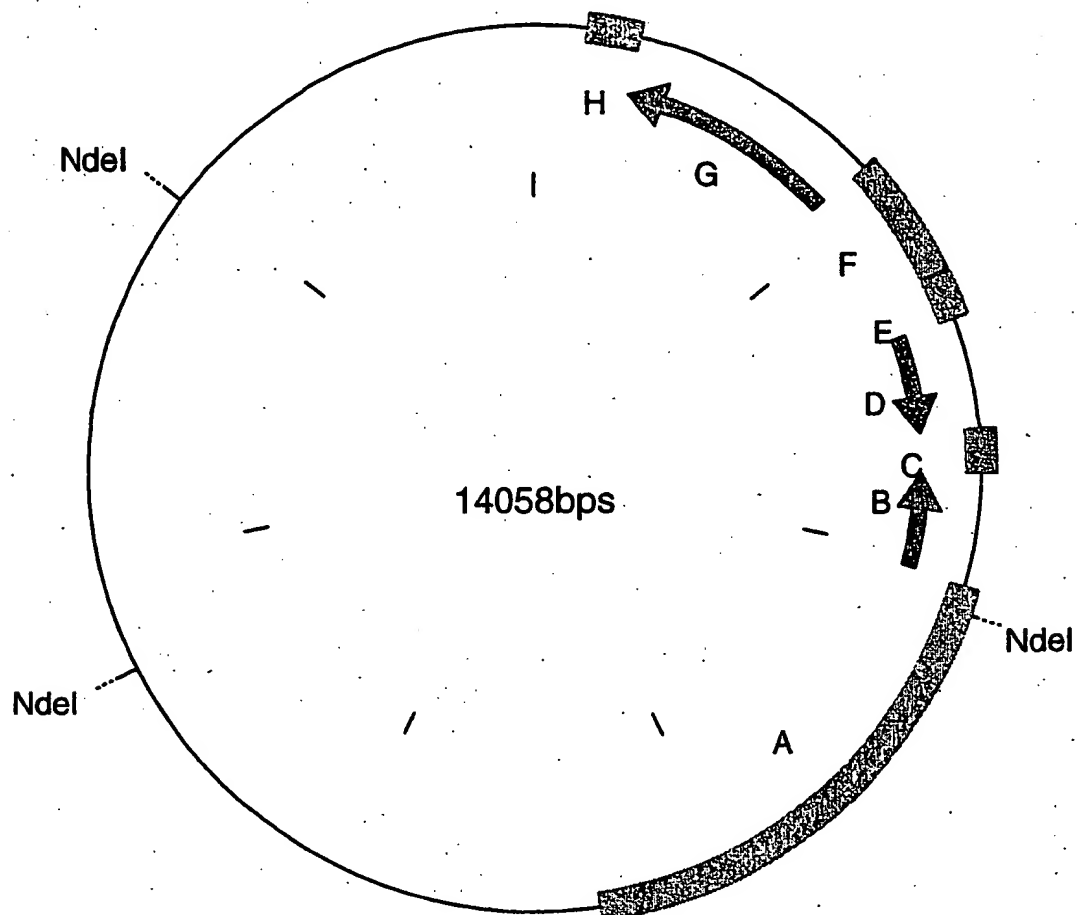


Abbildung 16:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst-USPP-AtTATase5-nost

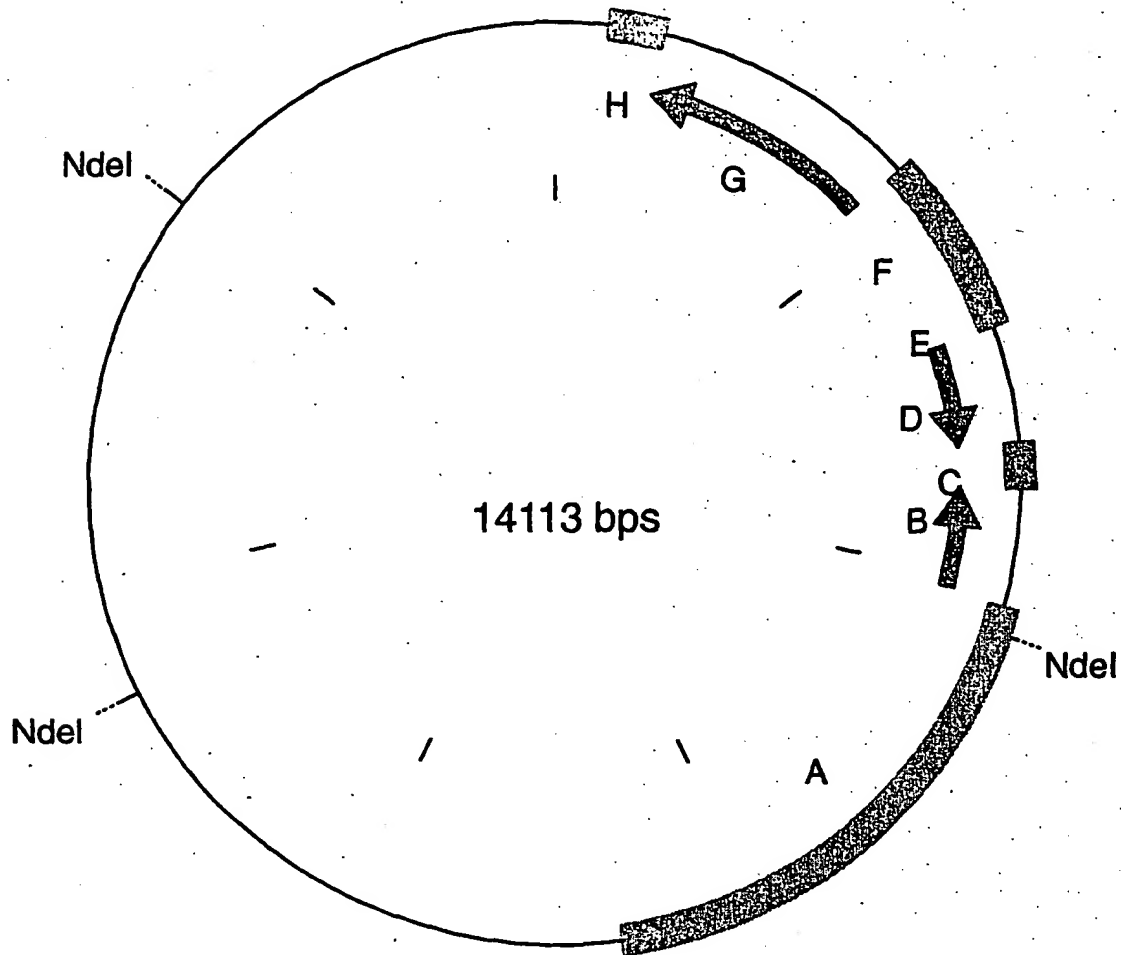


Abbildung 17:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst-USPP-AtTATase6-nost

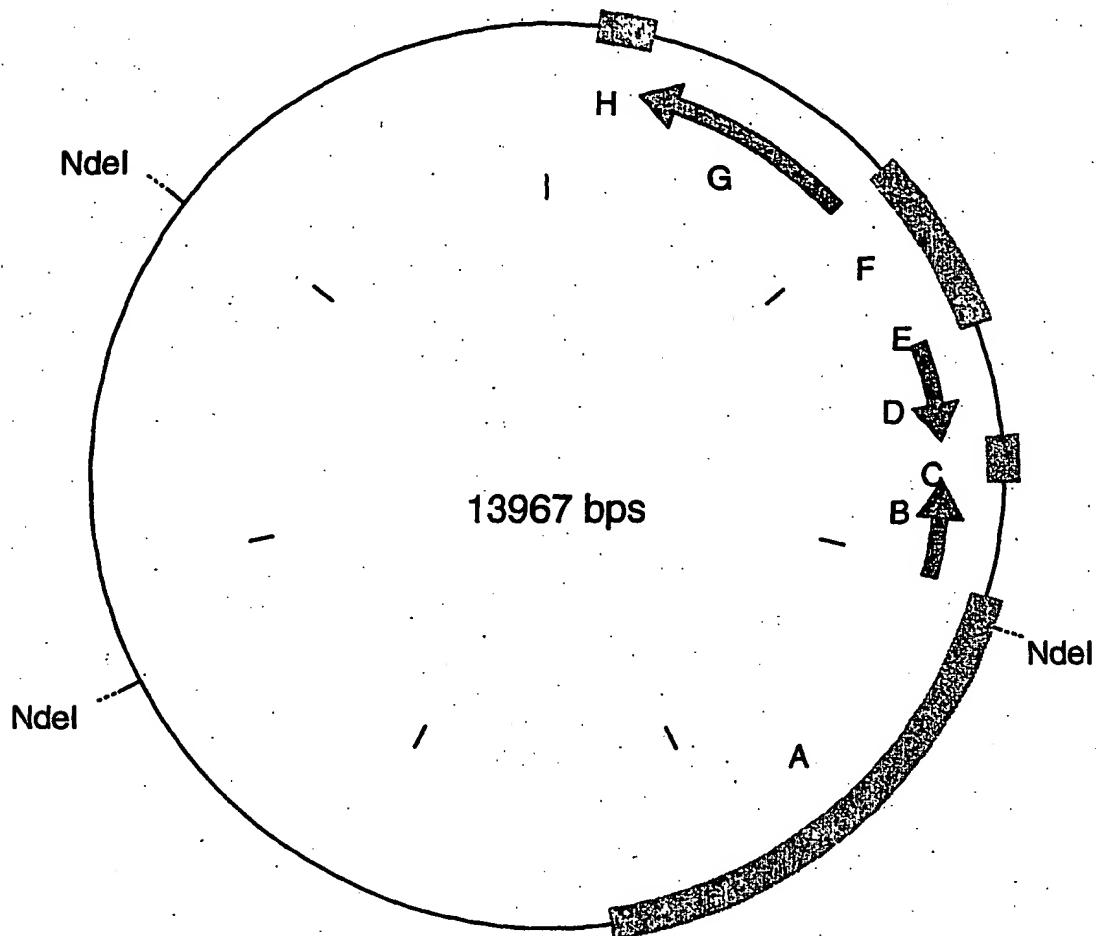
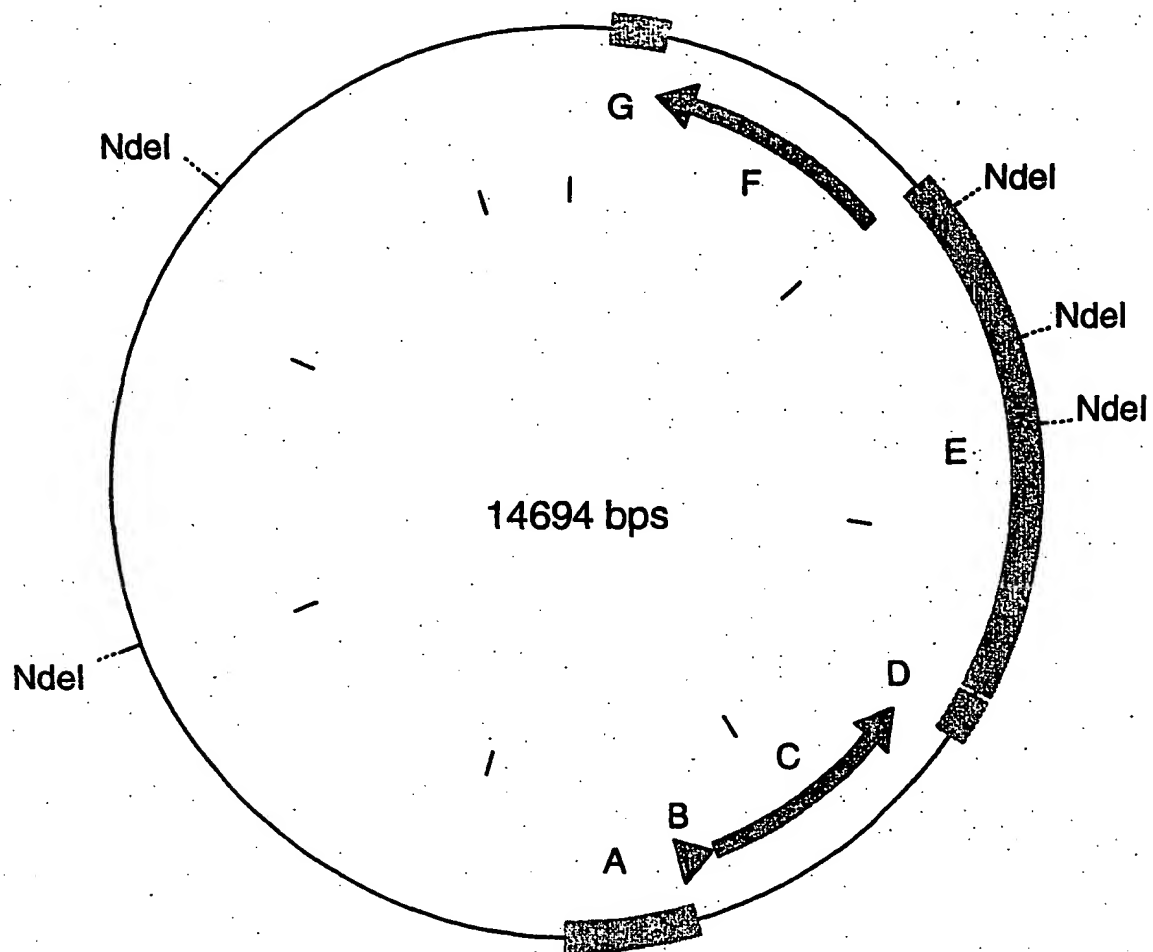


Abbildung 18: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nost-USPP-rbcS-RntATase-nost



19/63

Abbildung 19: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nost-USPP-AttTATase1-nost

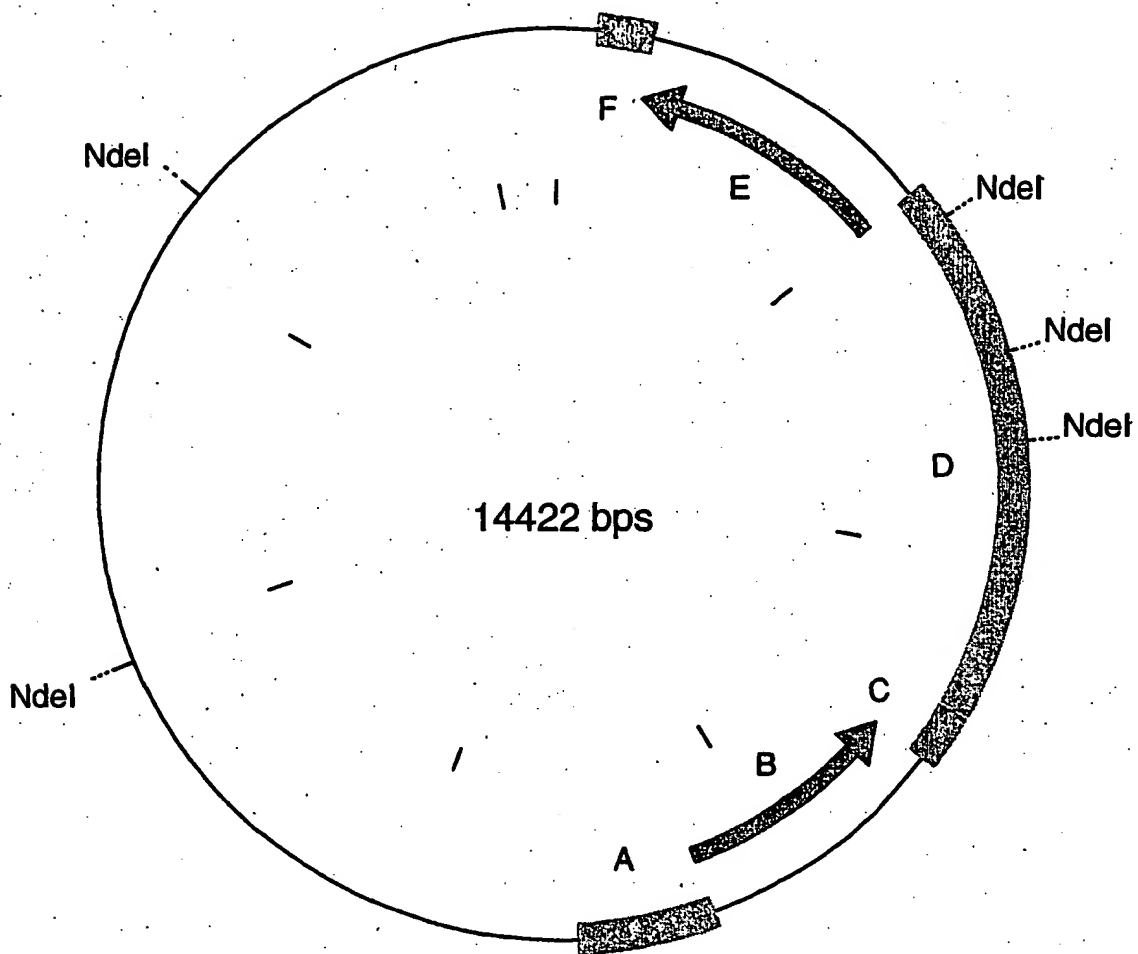


Abbildung 20: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nost-USPP-AtTATase3-nost

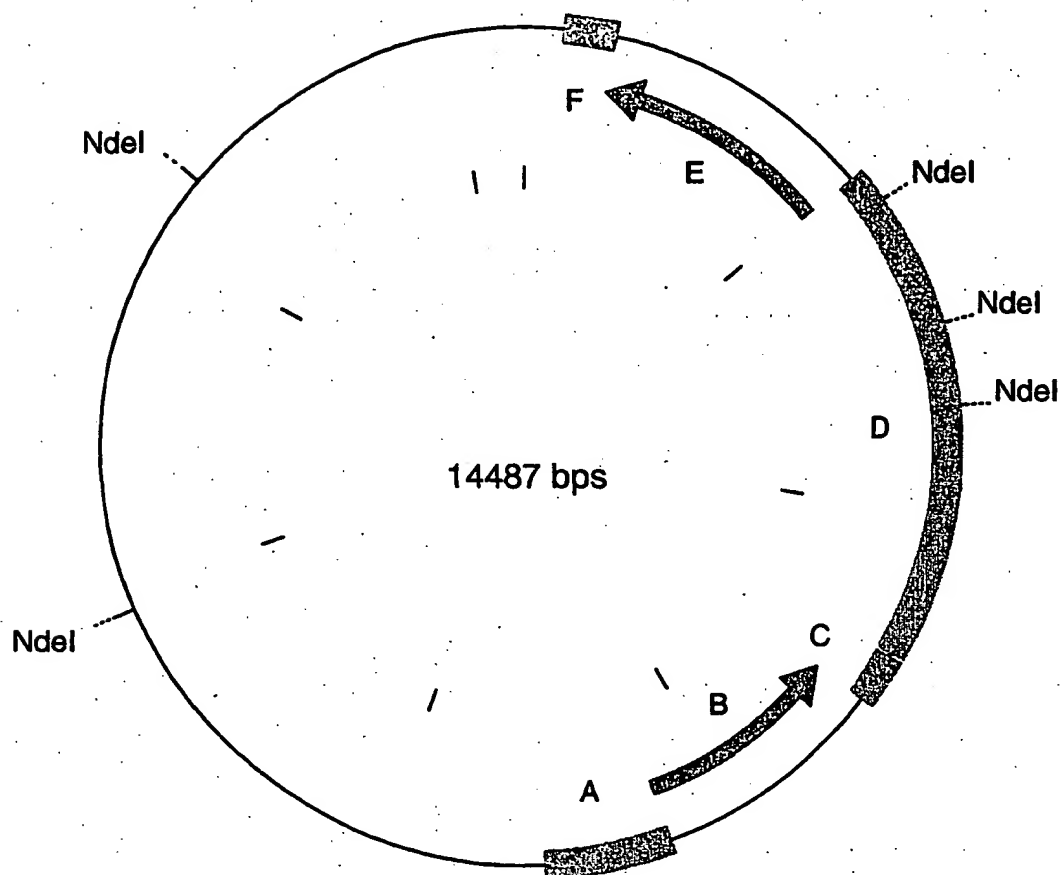
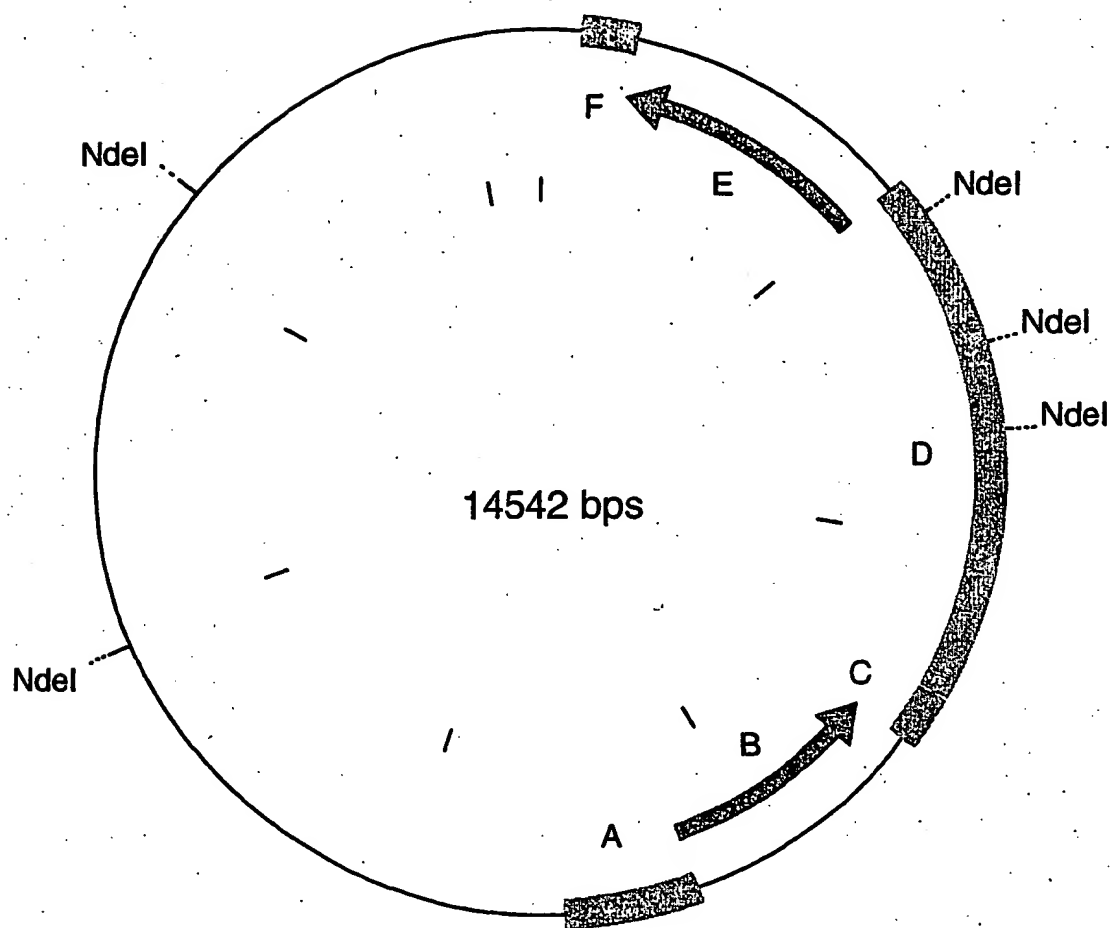


Abbildung 21: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AtTATase5-nosT



22/63

Abbildung 22: pSUN2-Leb4-NtGGPPOR-nost-USPP-AttTATase6-nost

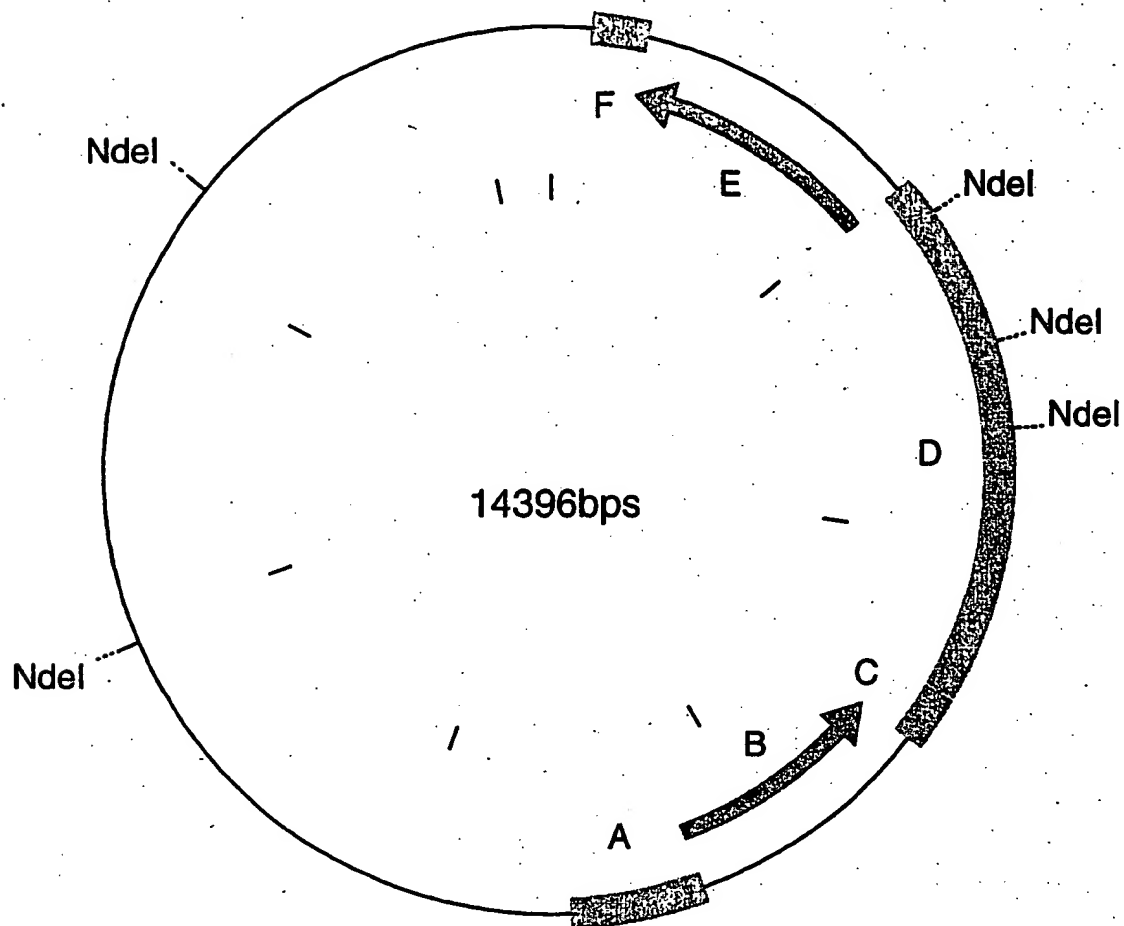


Abbildung 23: pSUN2-USP-AthPPD-ocsT-USPP-rbcS-RnTATase-nosT

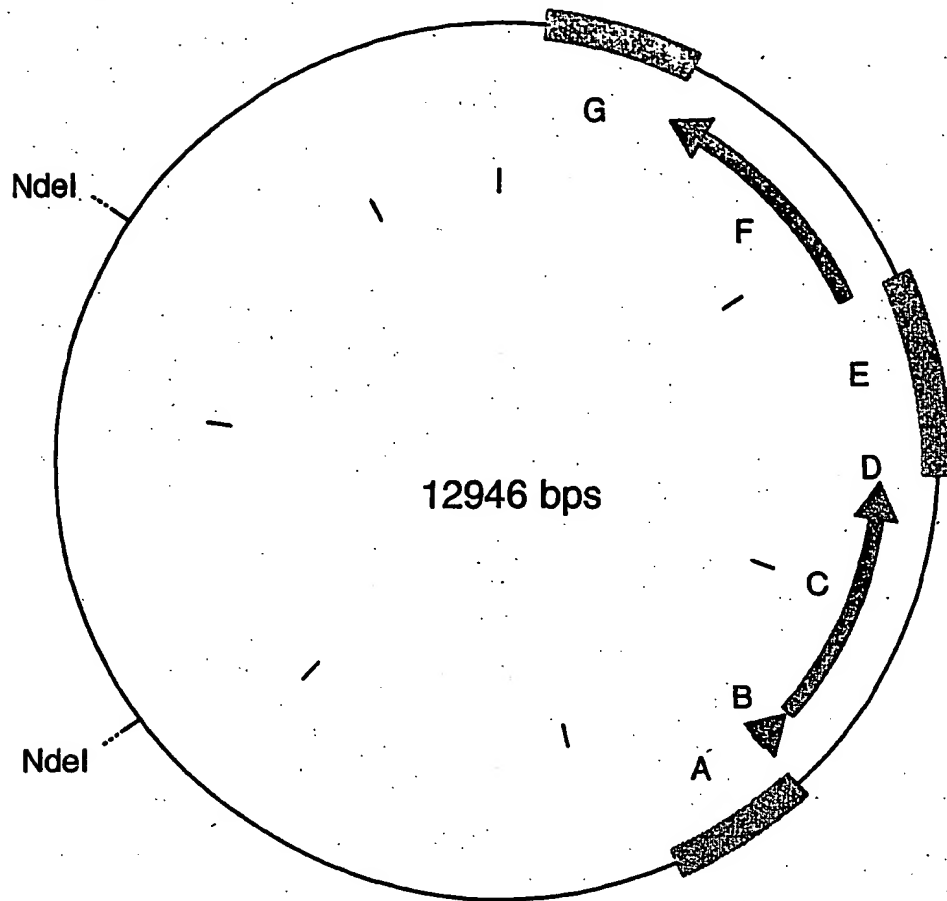
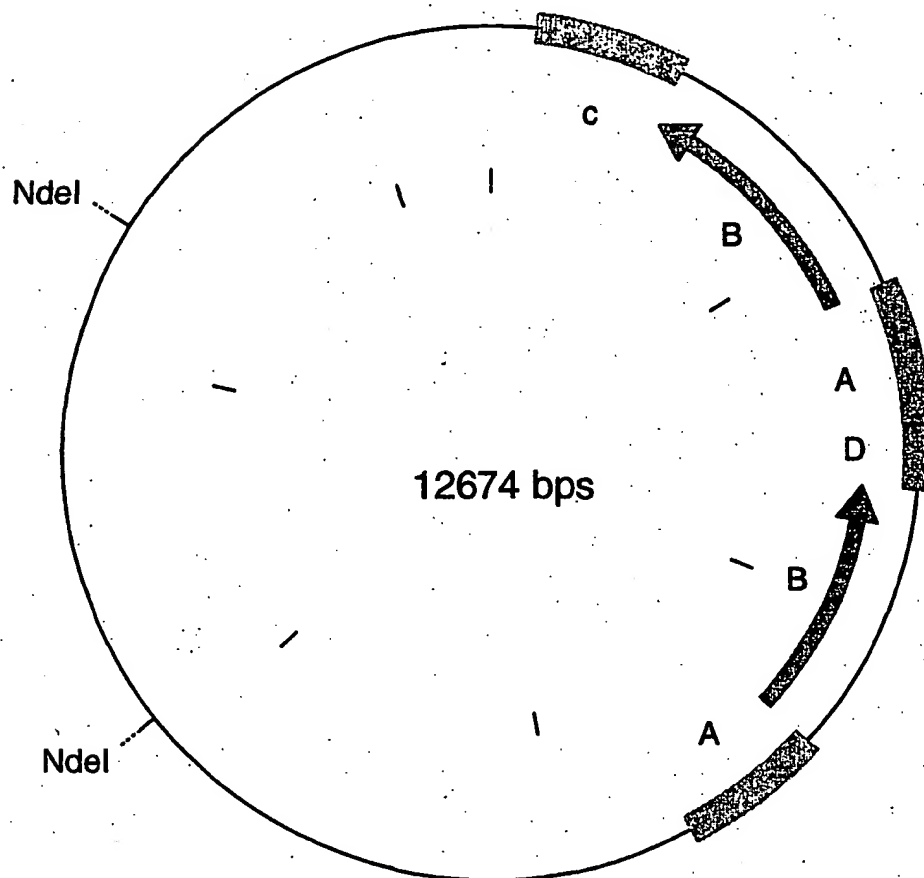
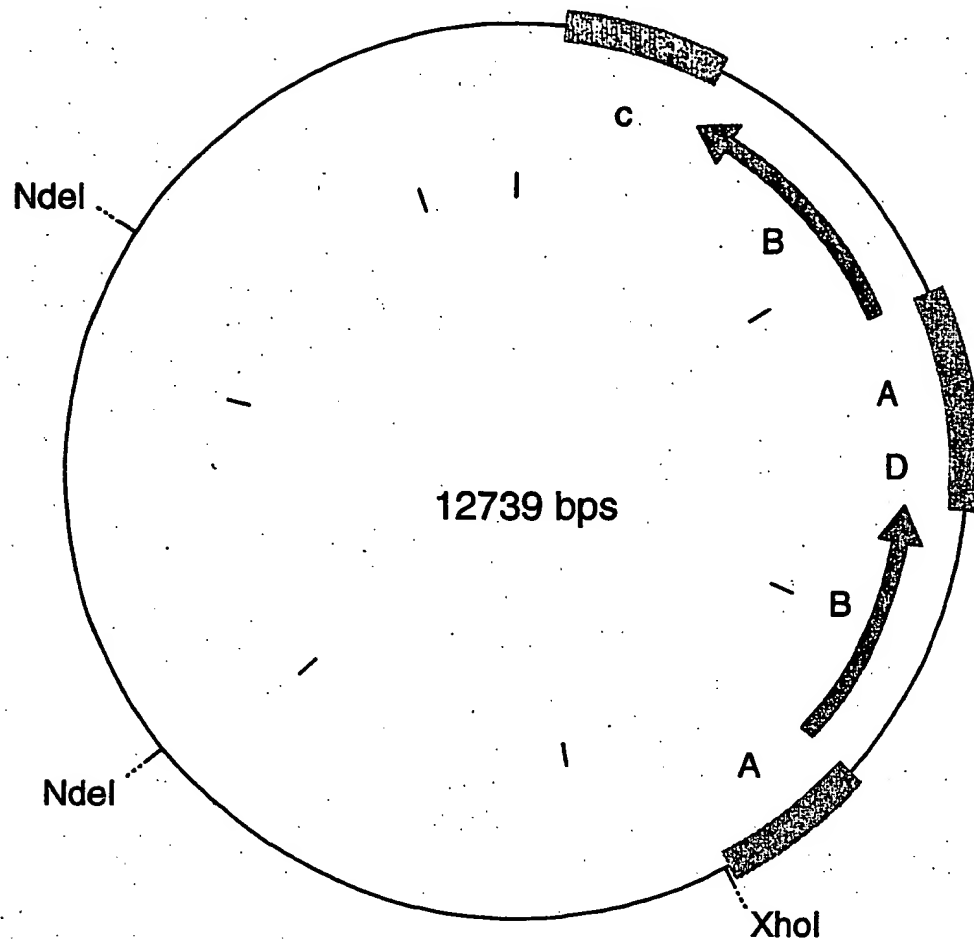


Abbildung 24: pSUN2-USP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtTATase1-nost



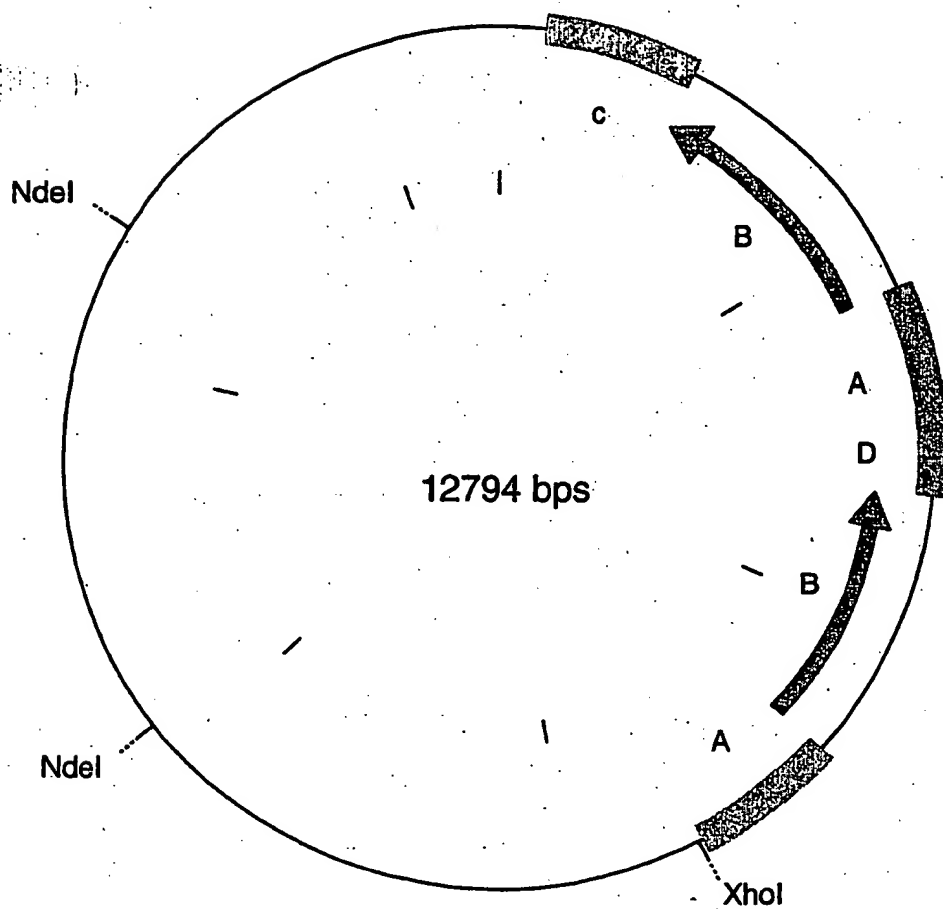
25/63

Abbildung 25: pSUN2-USP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtTATase3-nosT



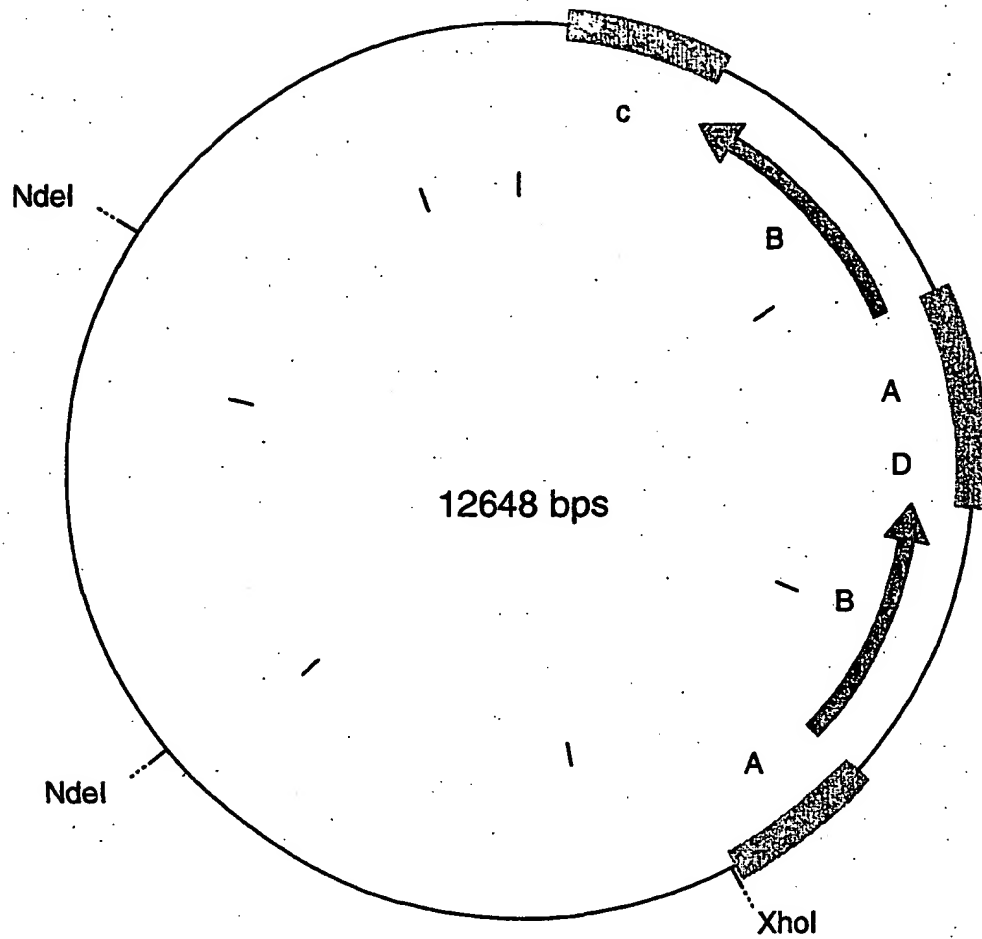
26/63

Abbildung 26: pSUN2-USP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtTATase5-nost



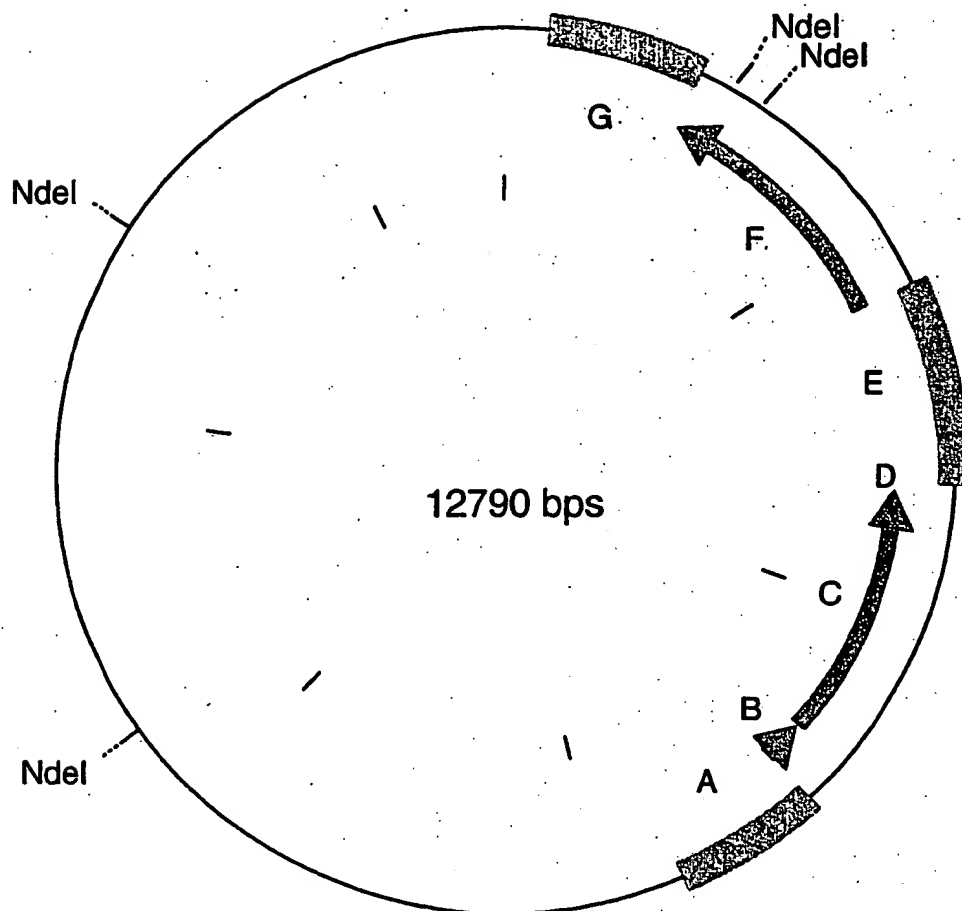
27/63

Abbildung 27: pSUN2-USP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtTATase6-nosT



28/63

Abbildung 28: pSUN2-USP-AtHPT-ocsT-USPP-rbcS-RnTATase6-nosT



29/63

Abbildung 29: pSUN2-USP-AtHPT-ocsT-USPP-AtTATase1-nost

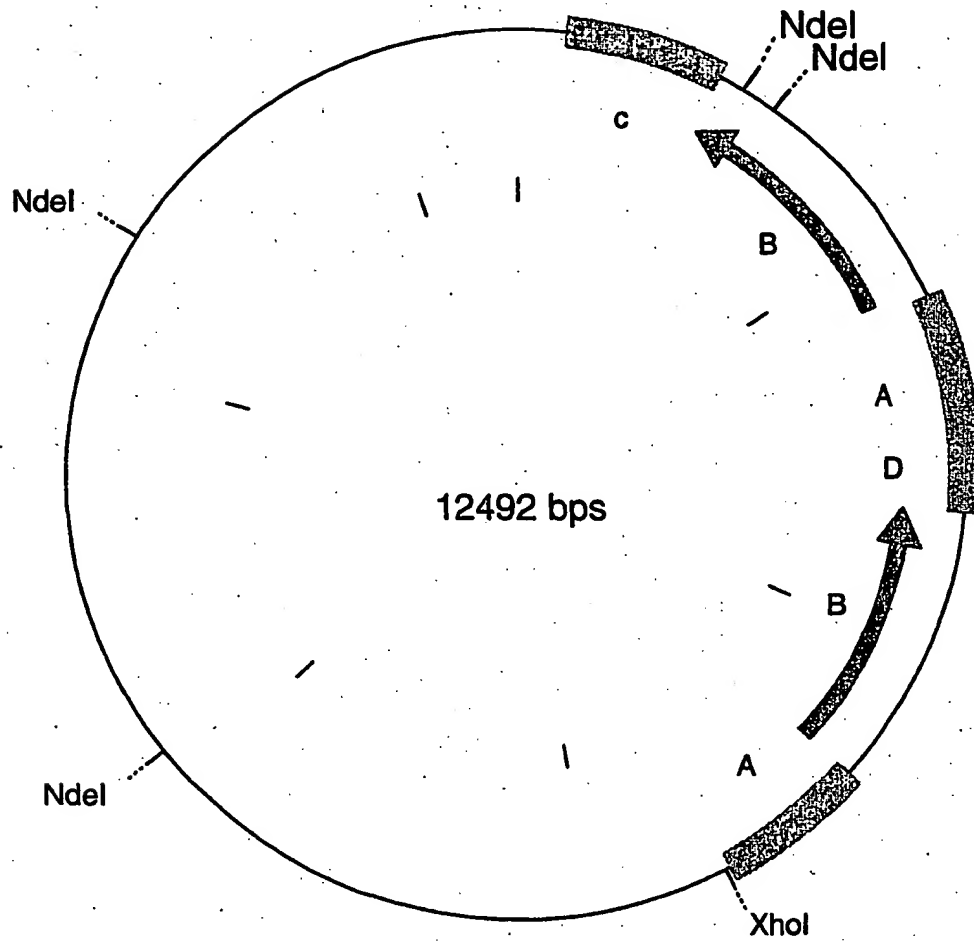


Abbildung 30: pSUN2-USP-AtHPT-ocsT-USPP-AtTATase3-nosT

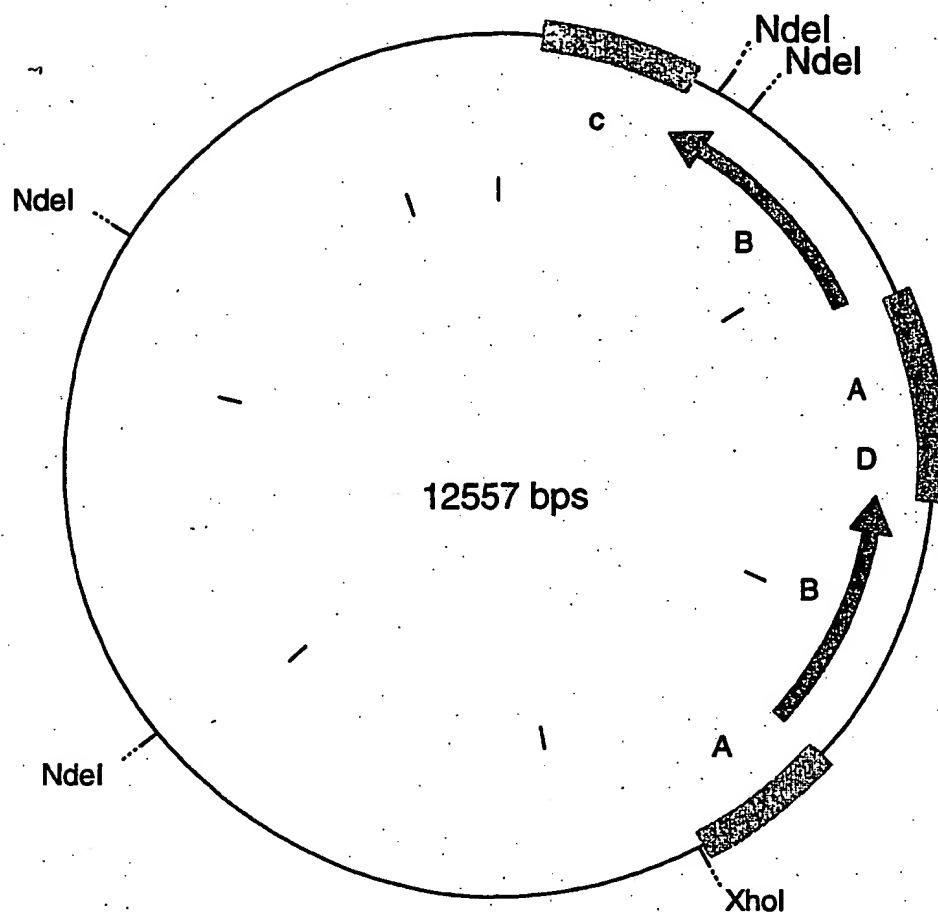
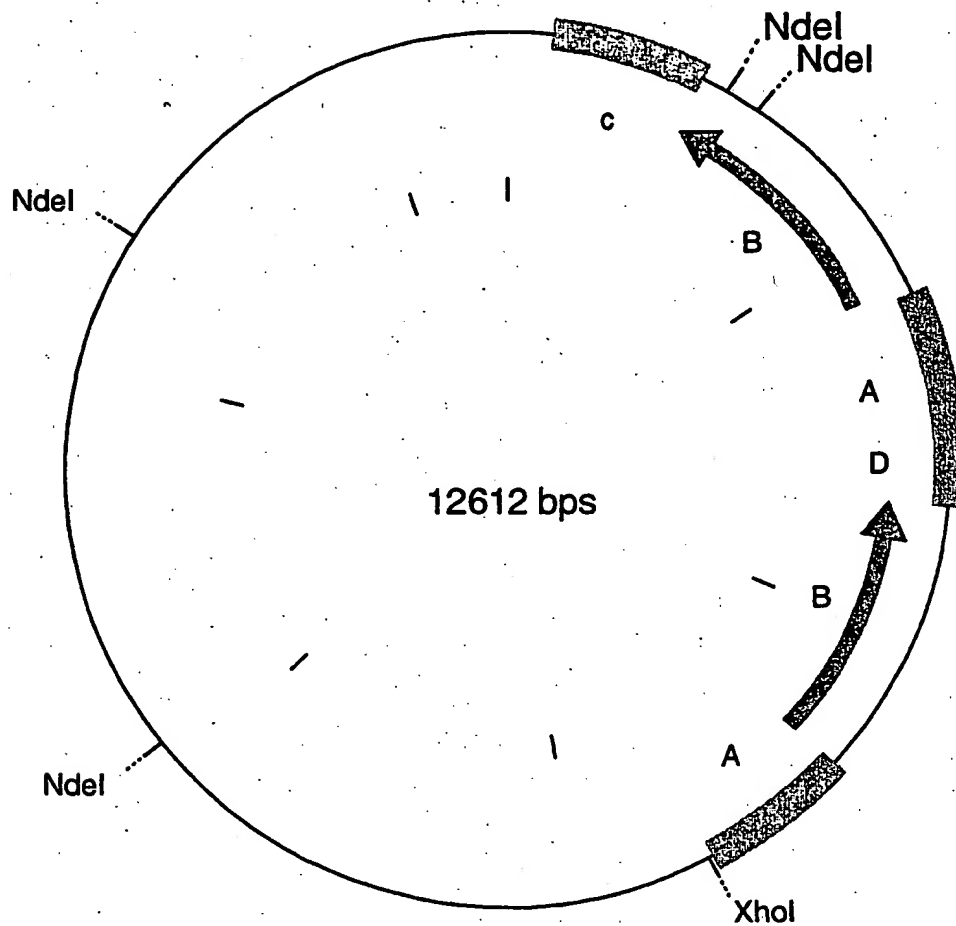
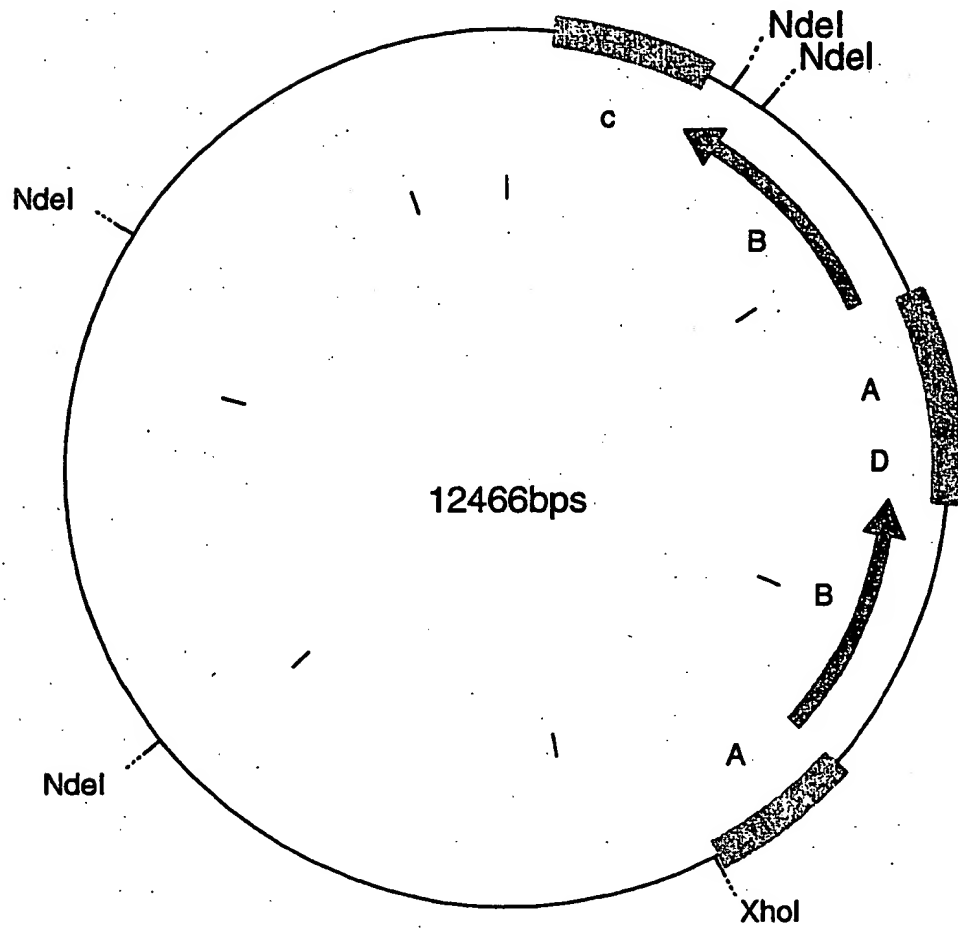


Abbildung 31: pSUN2-USP-AtHPT-ocsT-USPP-AtTATase5-nost



32/63

Abbildung 32: pSUN2-USP-AtHPT-ocsT-USPP-AtTATase6-nosT



33/63

Abbildung 33: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nost-USPP-rbcS-RnTATase-nost

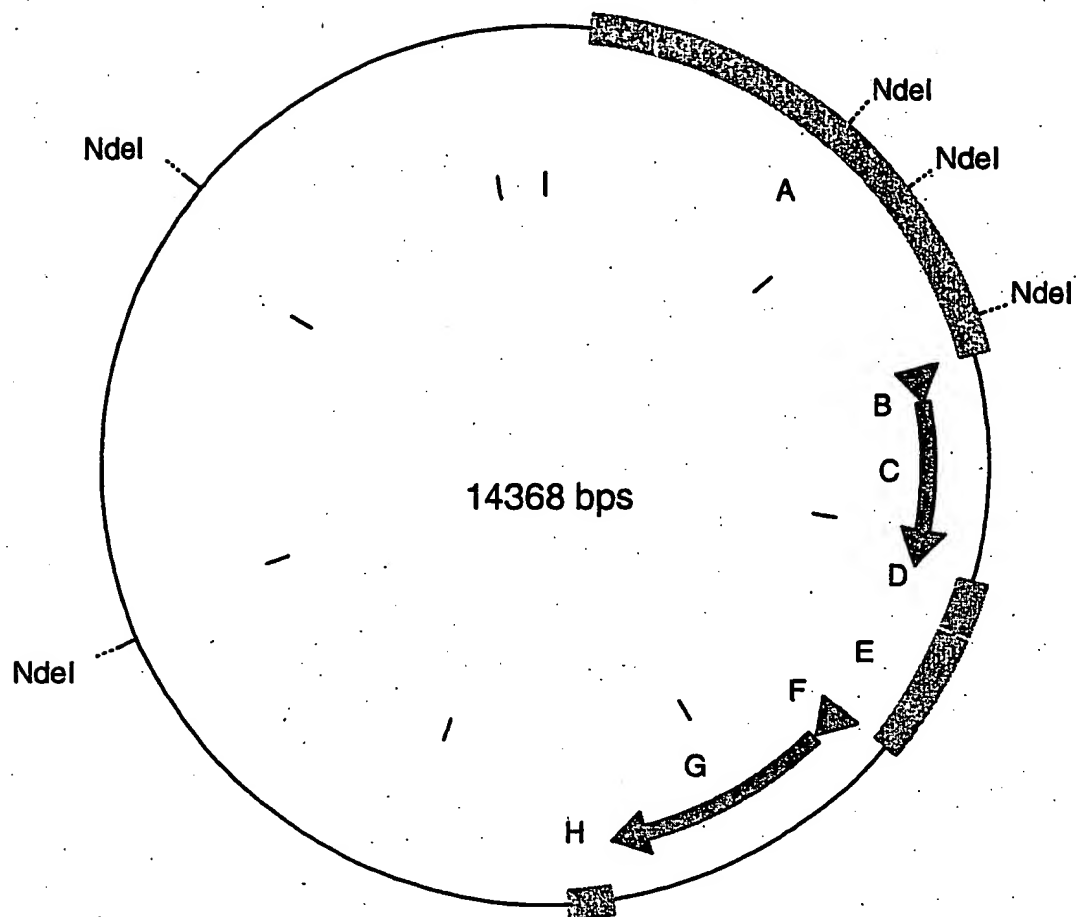
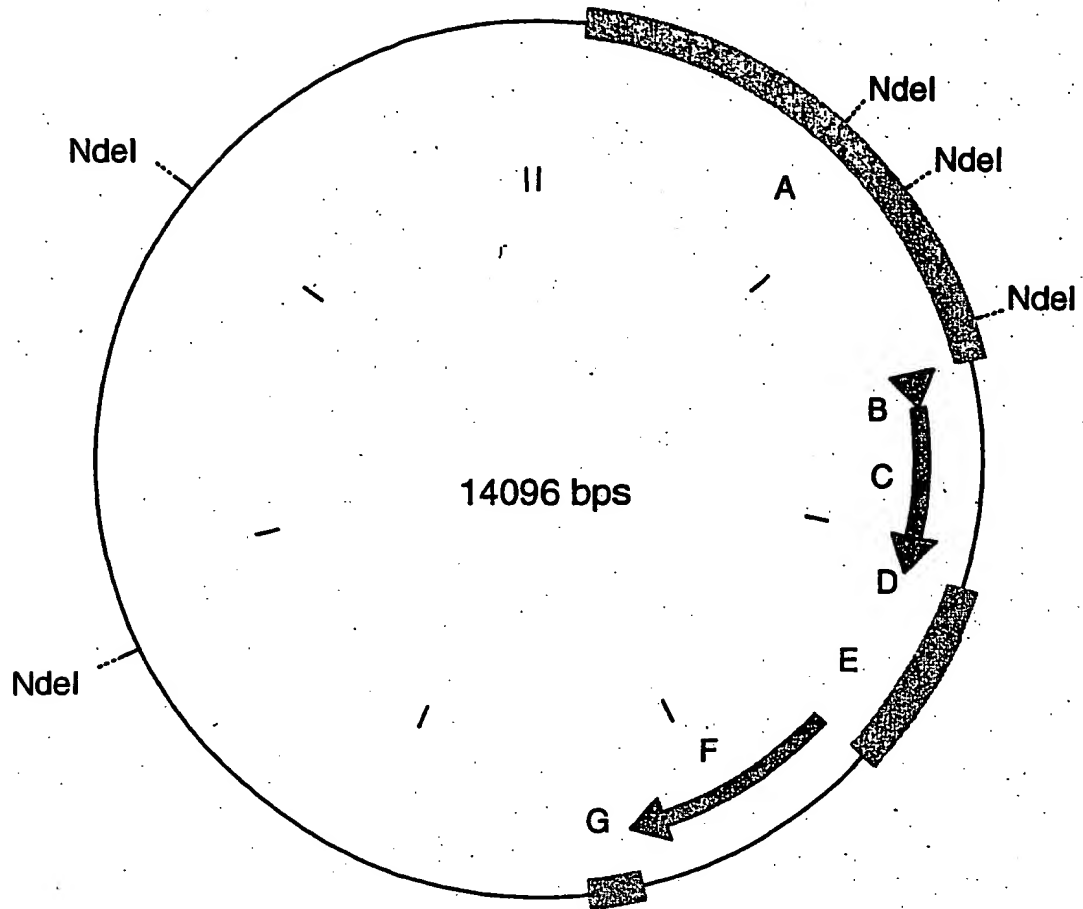
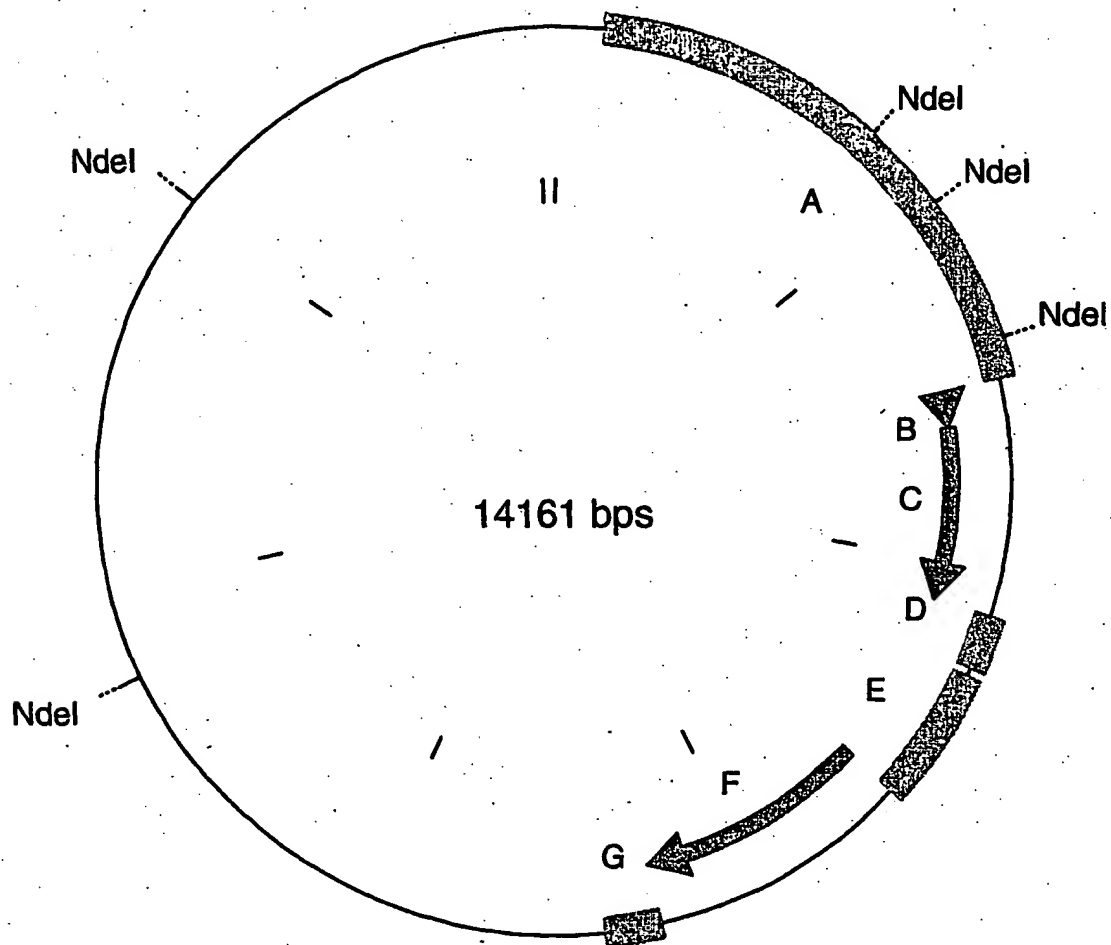


Abbildung 34: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nosT-USPP-AtTATase1-nosT



35/63

Abbildung 35: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nost-USPP-AtTATase3-nost



36/63

Abbildung 36: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nosT-USPP-AtTATase5-nosT

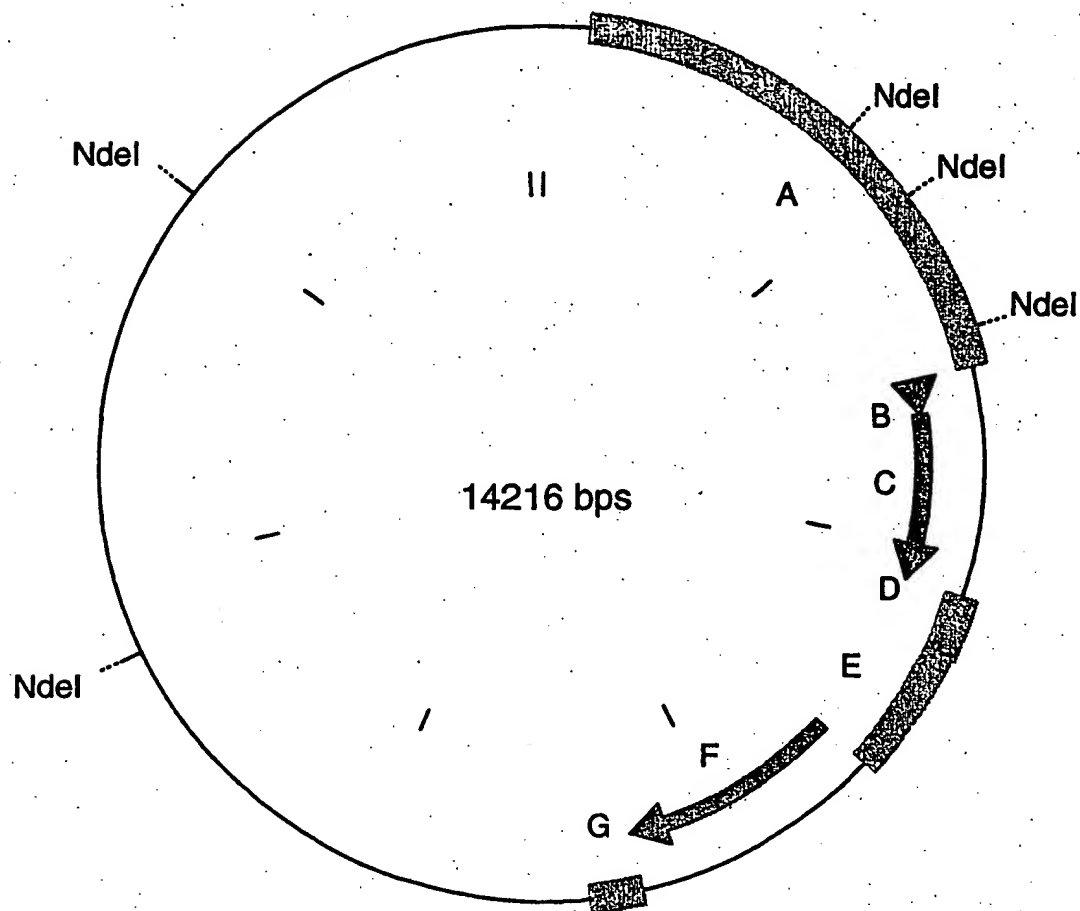
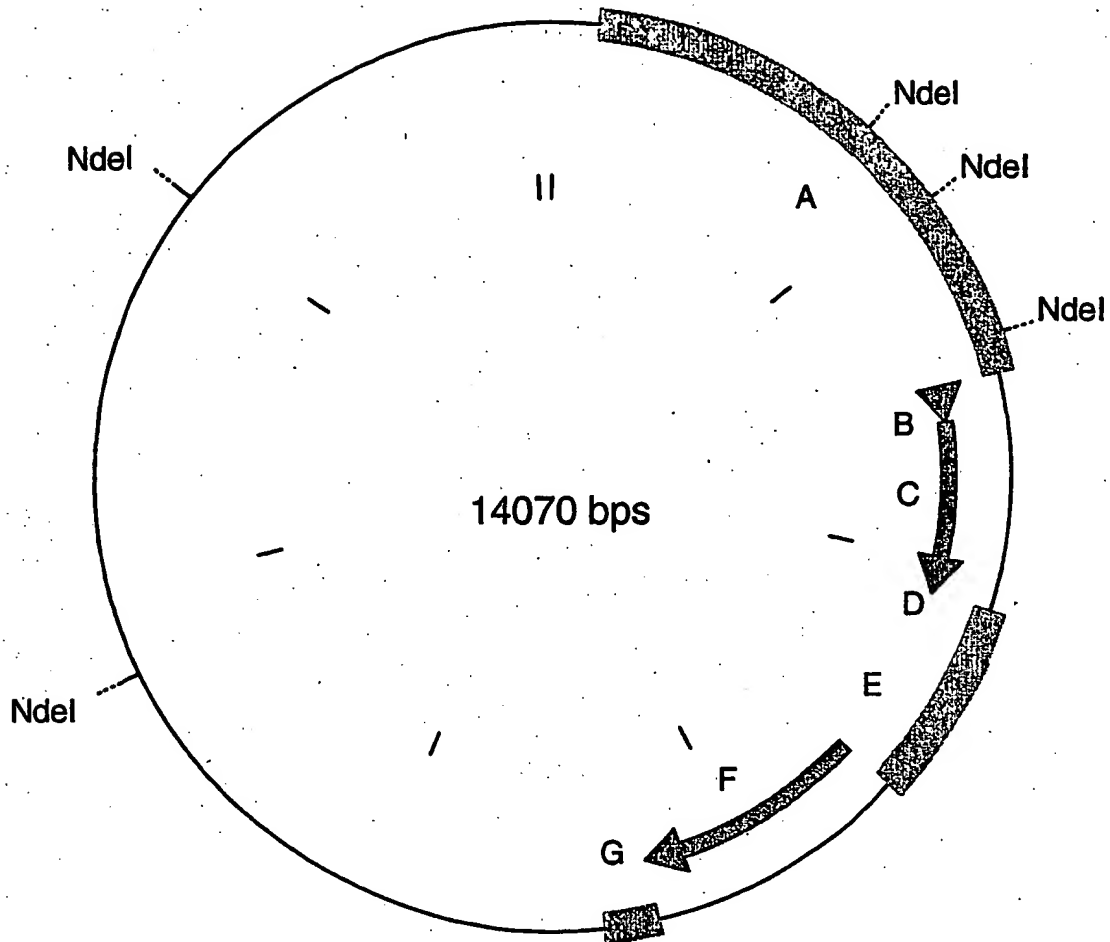
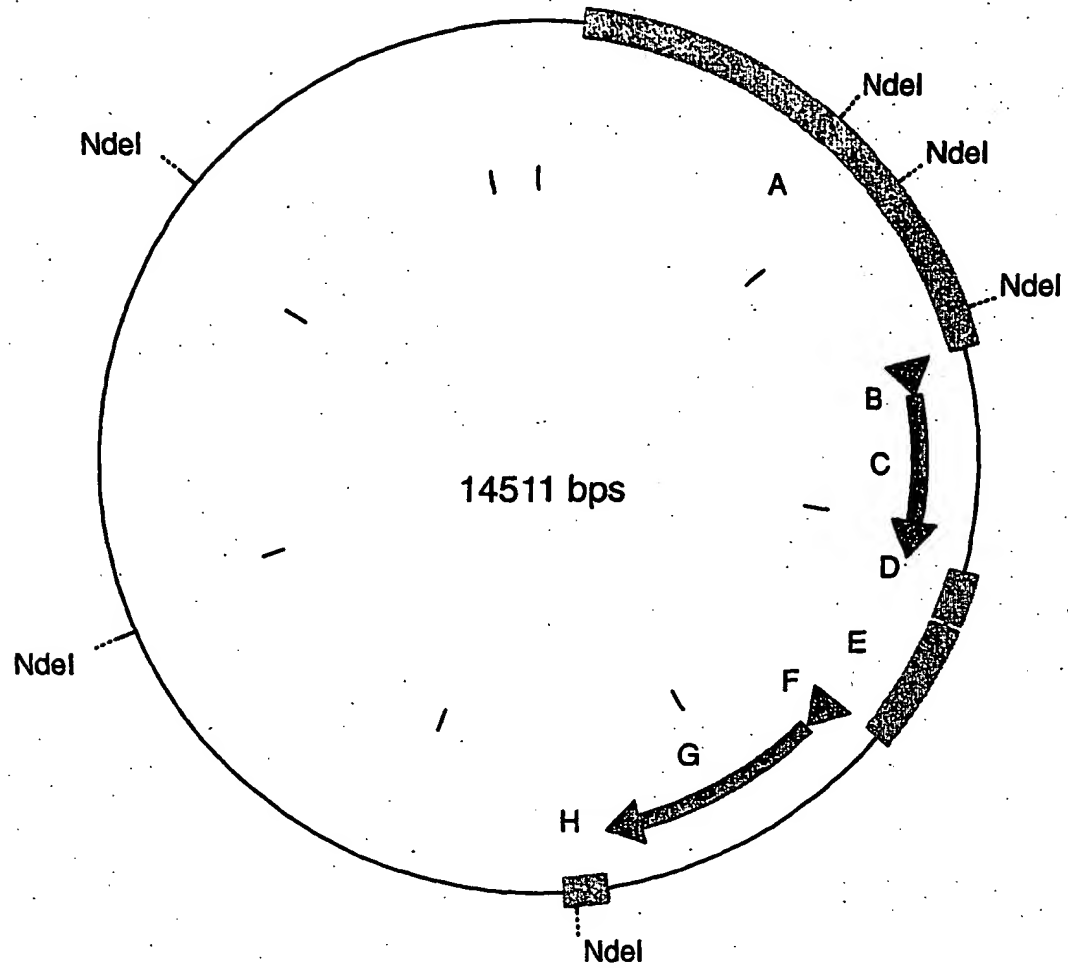


Abbildung 37: pSUN2-Leb4-IPP-SynMT1-nost-USPP-AtTATase6-nost



38/63

Abbildung 38: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nost-USPP-rbcS-RnTA-Tase-nost



39/63

Abbildung 39: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nost-USPP-AtTATase1-nost

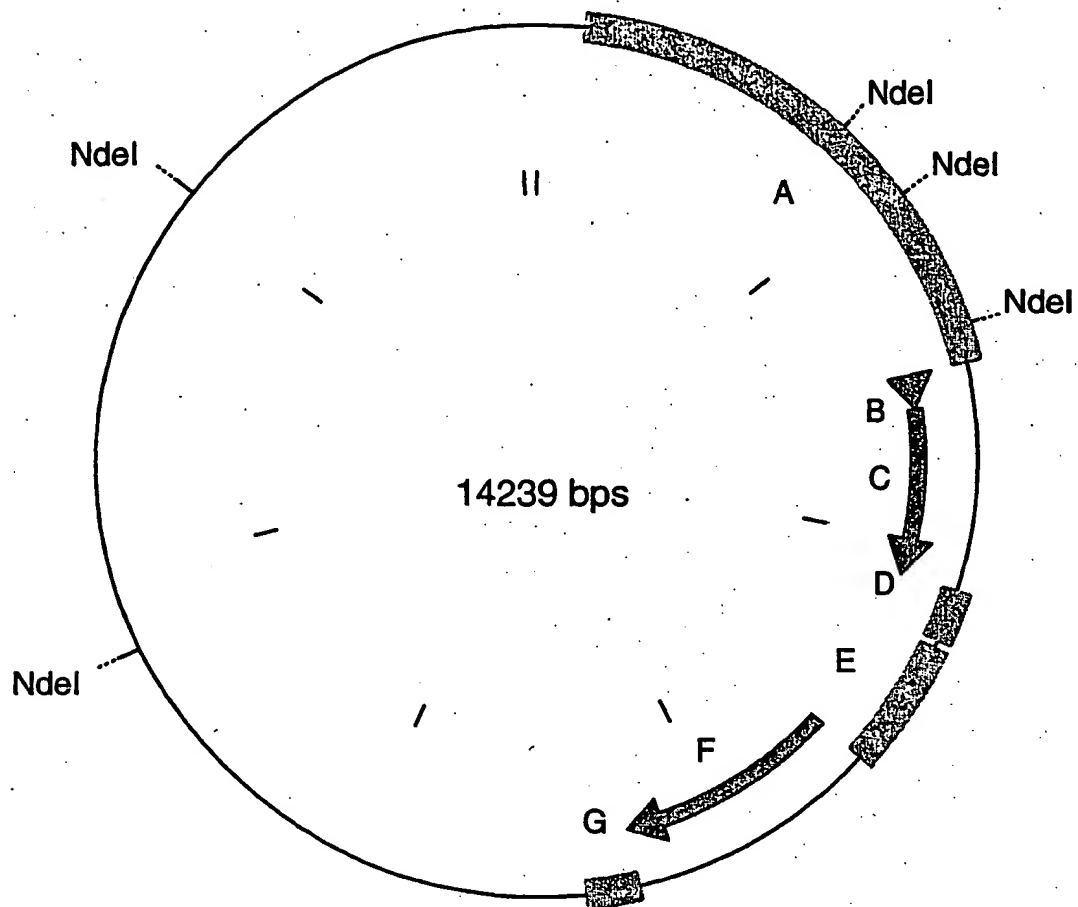
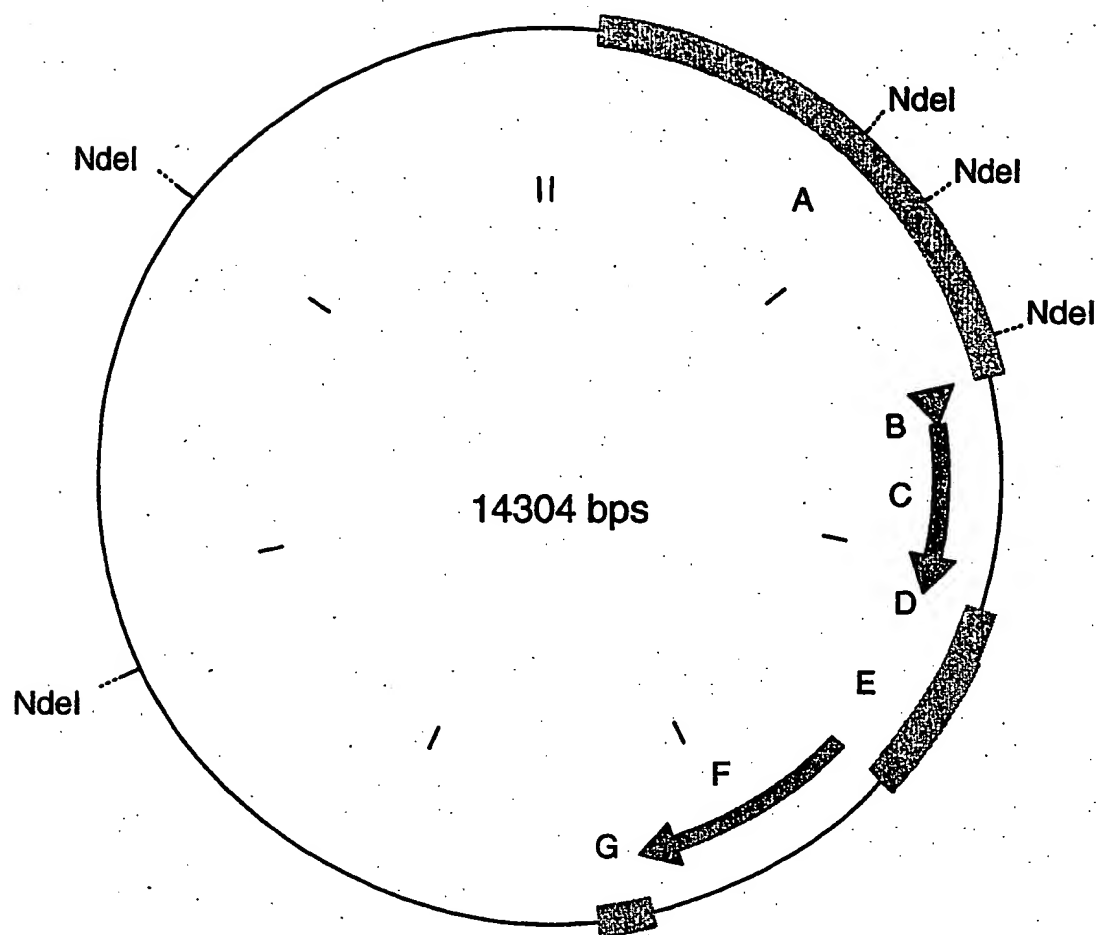
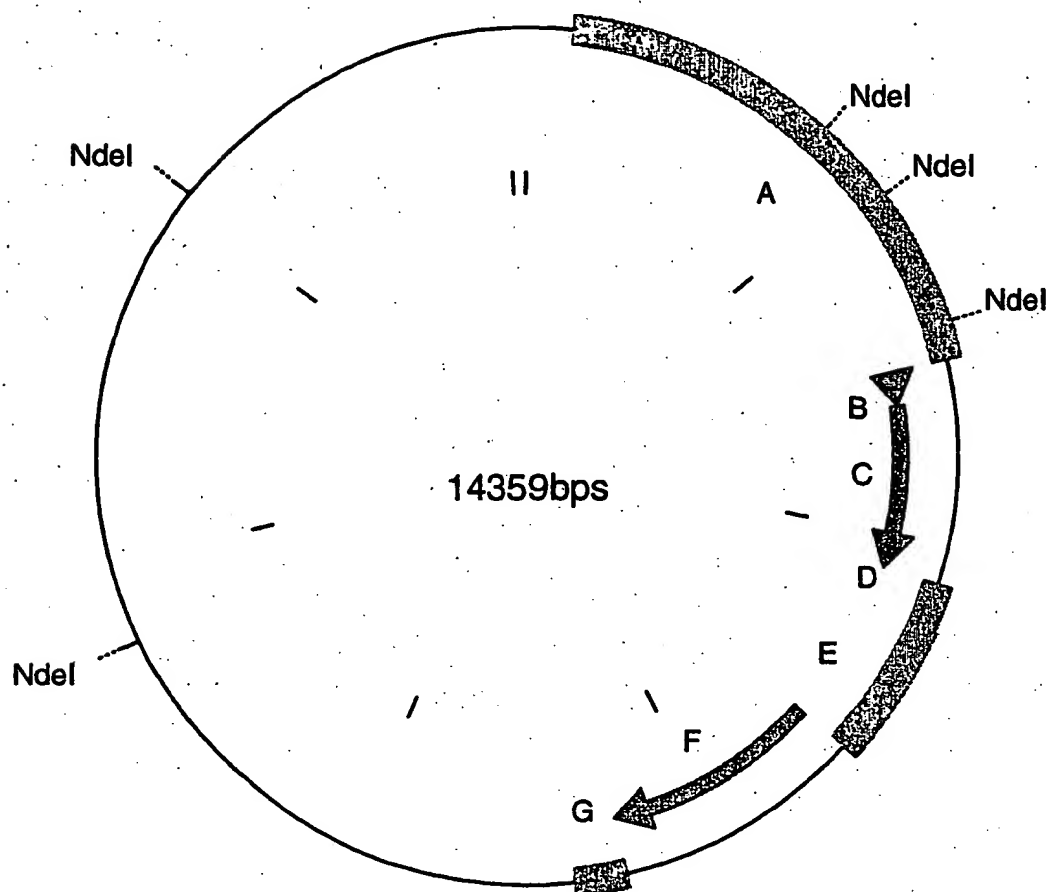


Abbildung 40: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nosT-USPP-AtTATase3-nosT

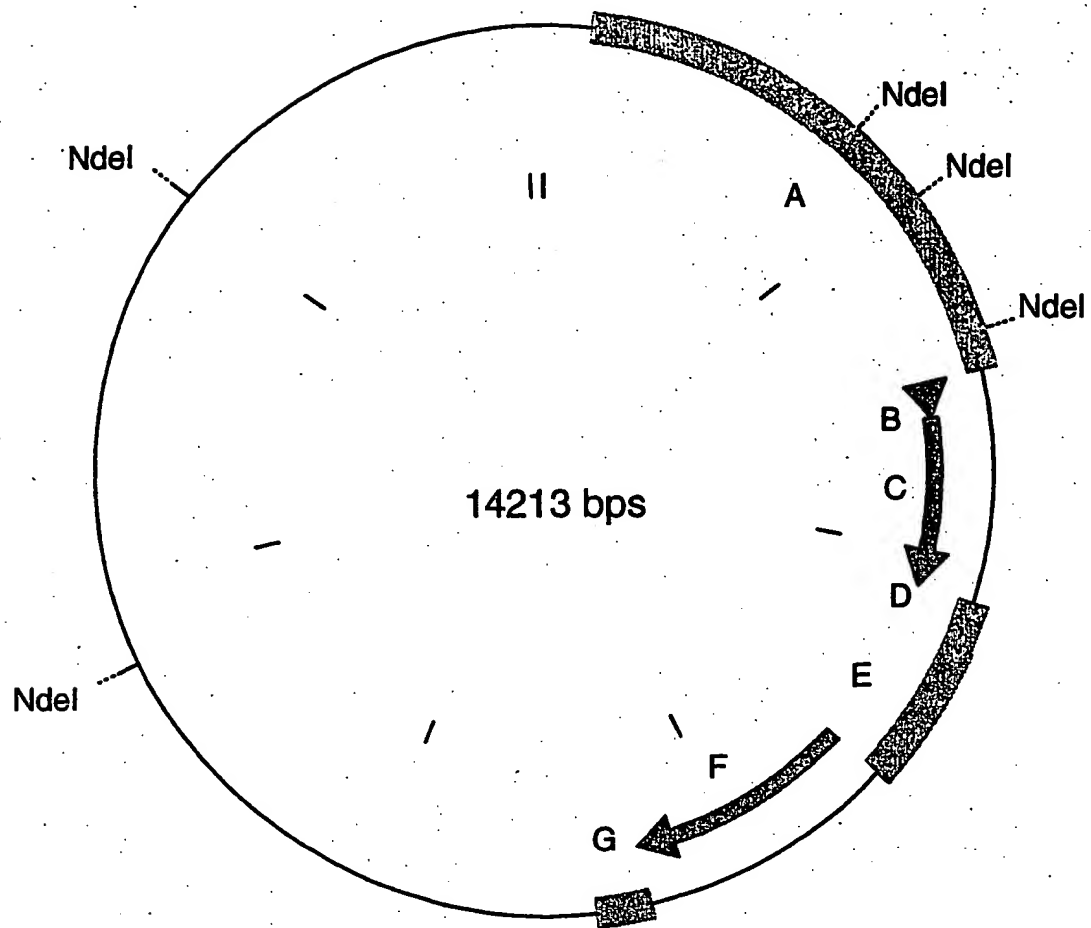


41/63

Abbildung 41: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nosT-USPP-AtTATase5-nosT

42/63

Abbildung 42: pSUN2-Leb4-IPP-SynCyc-nost-USPP-AtTATase6-nost



43/63

Abbildung 43: pSUN2-SBPP-AtγTMT-nost-USPP-rbcS-RnTATase-nost

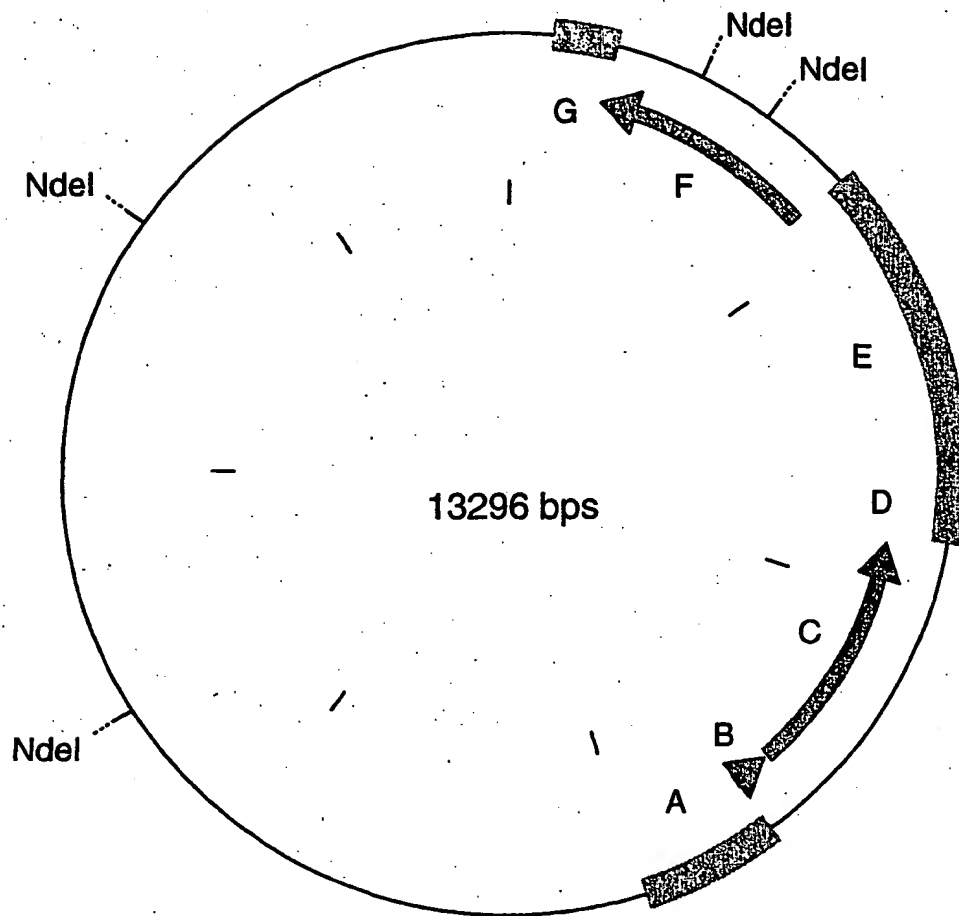
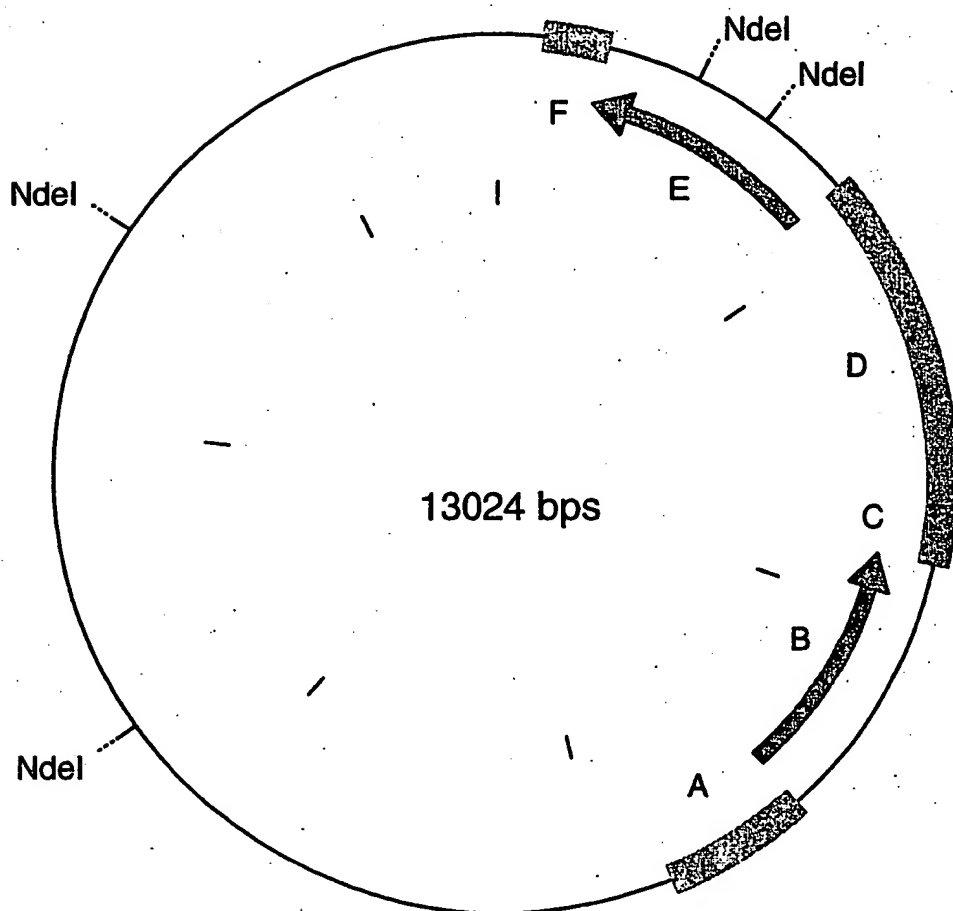
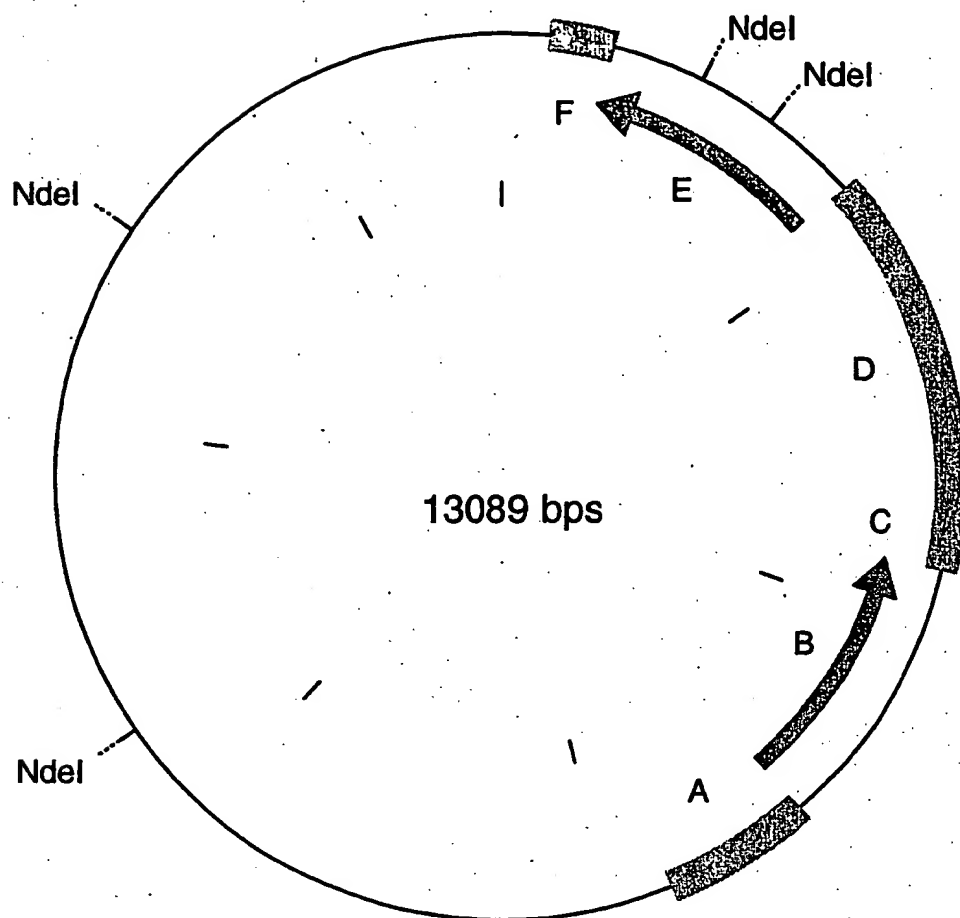


Abbildung 44: pSUN2-SBP-AtγTMT-nost-USPP-AtTATase1-nost



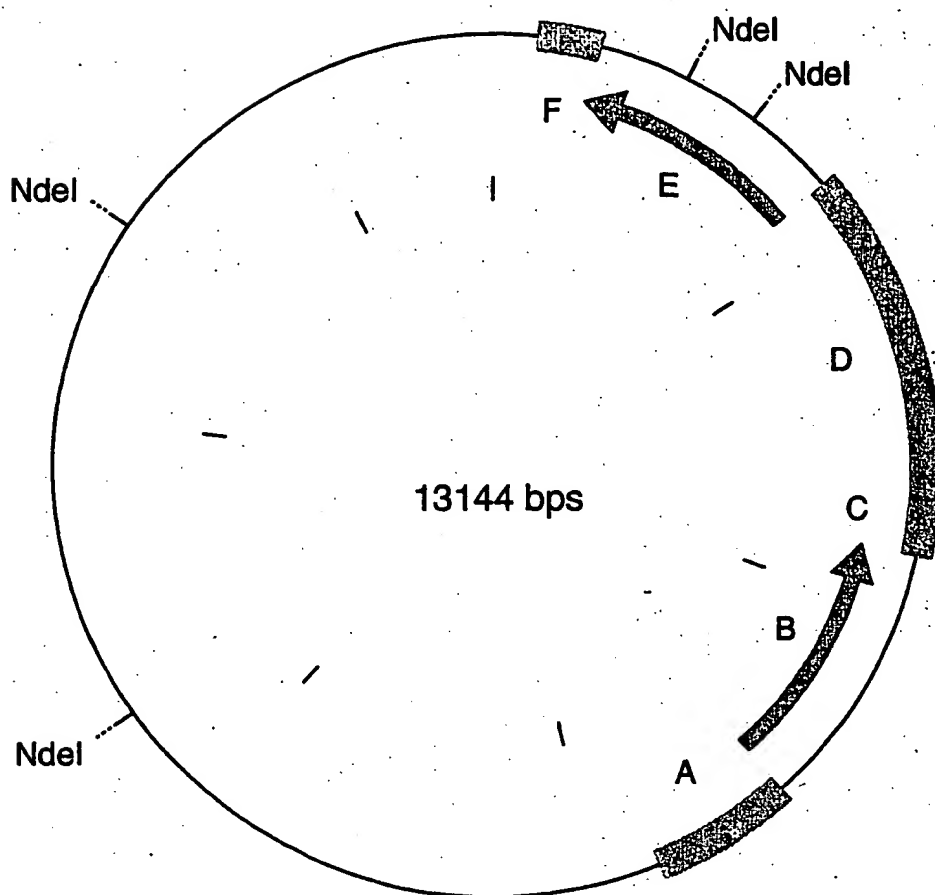
45/63

Abbildung 45: pSUN2-SBP-AtTMT-nost-USPP-AtTATase3-nost



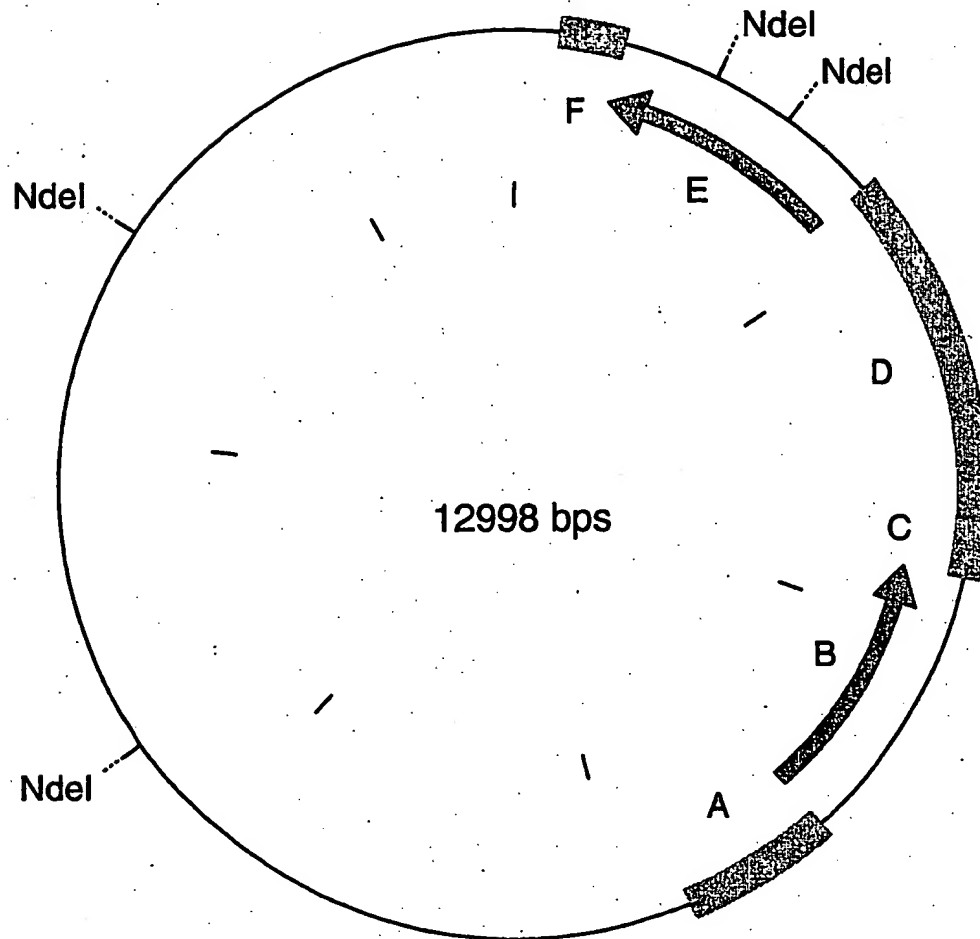
46/63

Abbildung 46: pSUN2-SBP-AtγTMT-nost-USPP-AtTATase5-nost



47/63

Abbildung 47: pSUN2-SBP-AtγTMT-nost-USPP-AtTATase6-nost



48/63

Abbildung 48:

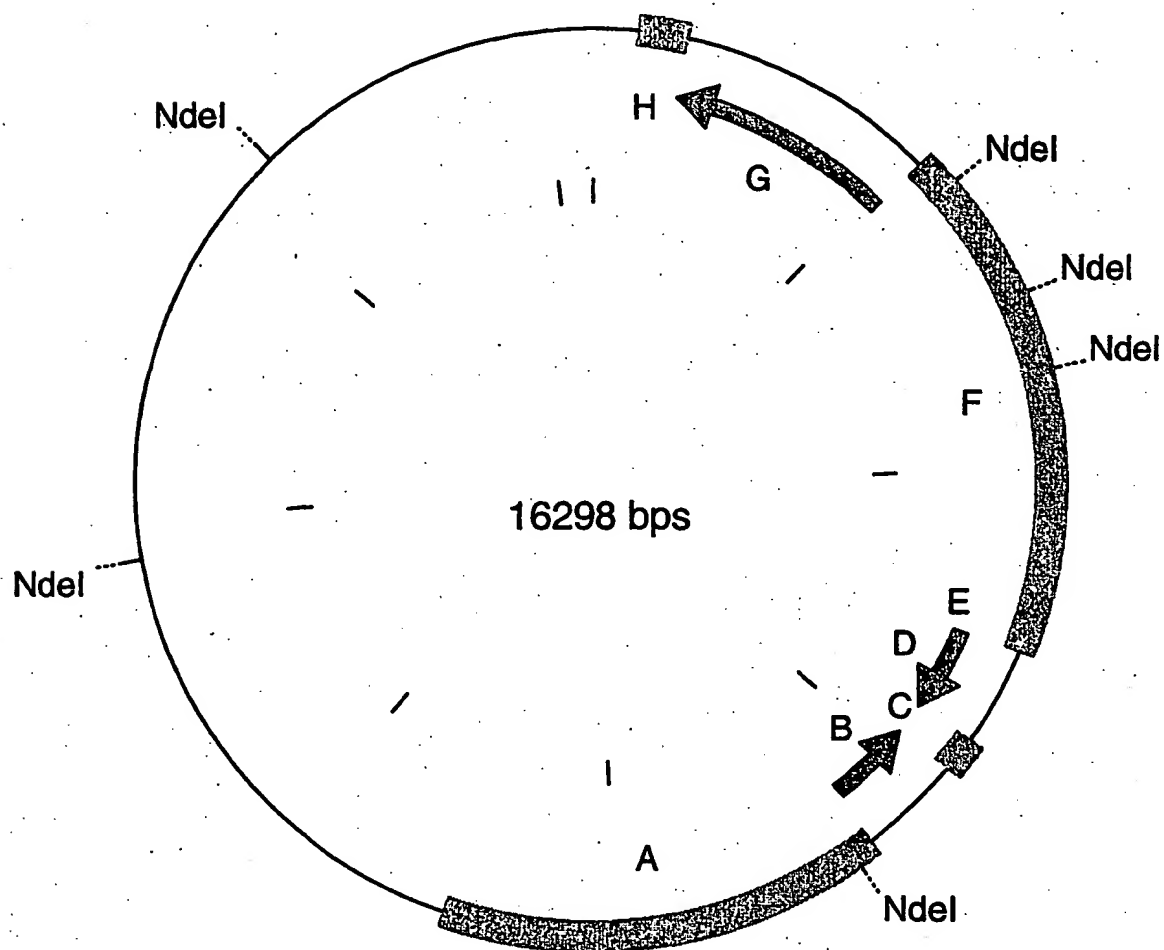
pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-LeB4-NtGGPPOR-nosT

Abbildung 49:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-USPP-AtHPPD-ocsT

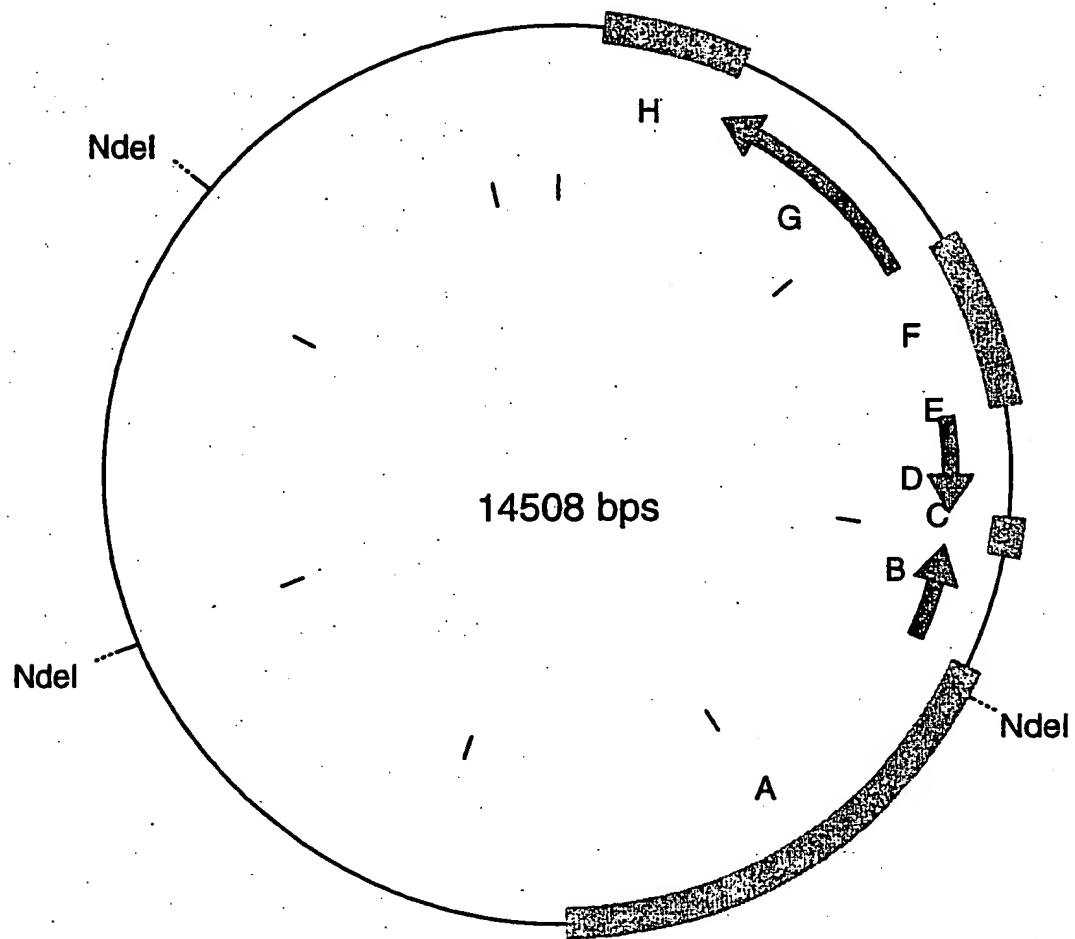


Abbildung 50:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst-USPP-AtHPT-ocst

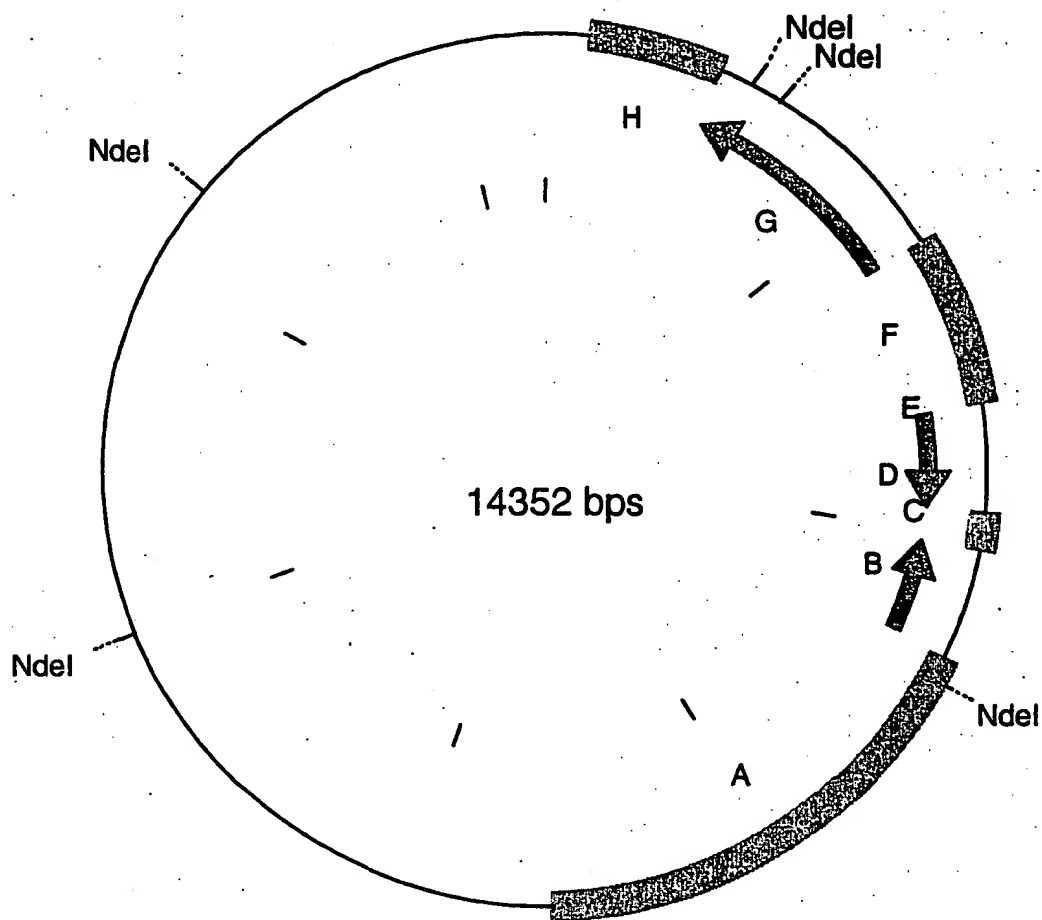


Abbildung 51:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocst-LeB4-IPP-SynMT1-nost

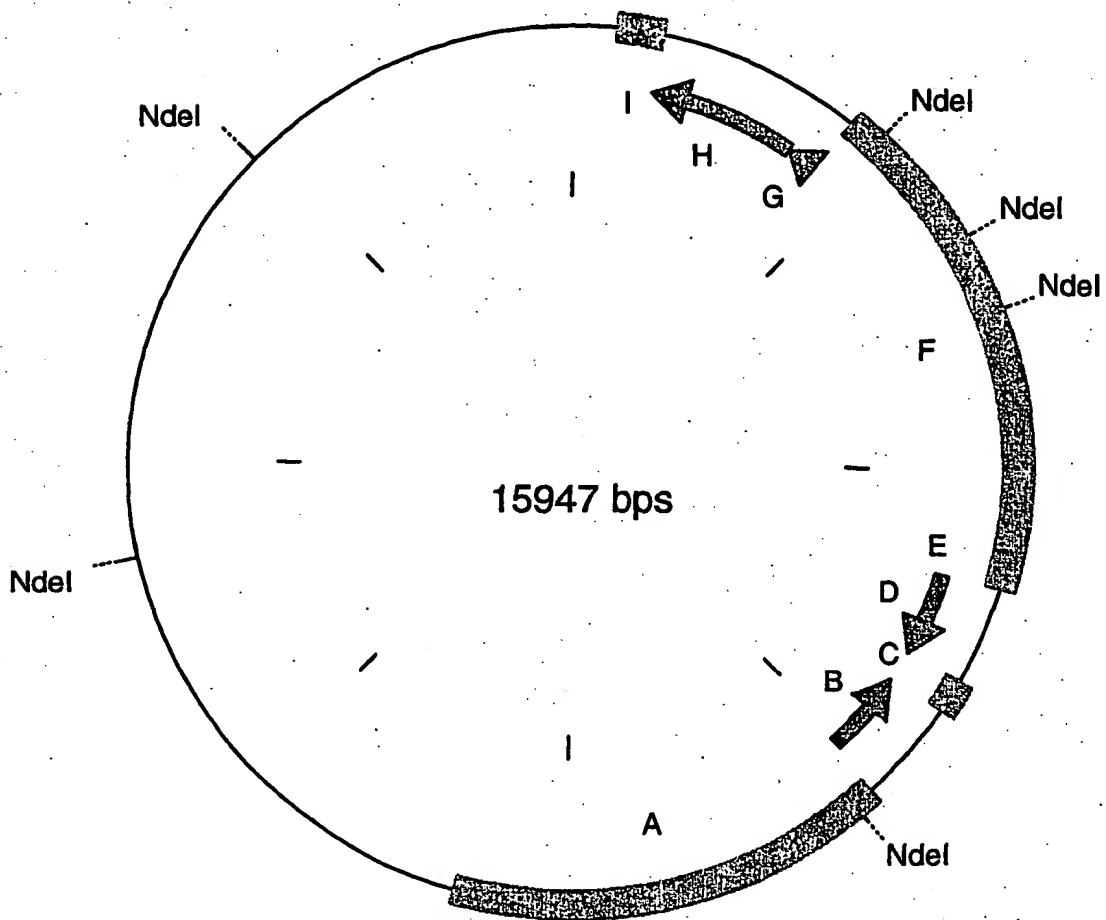
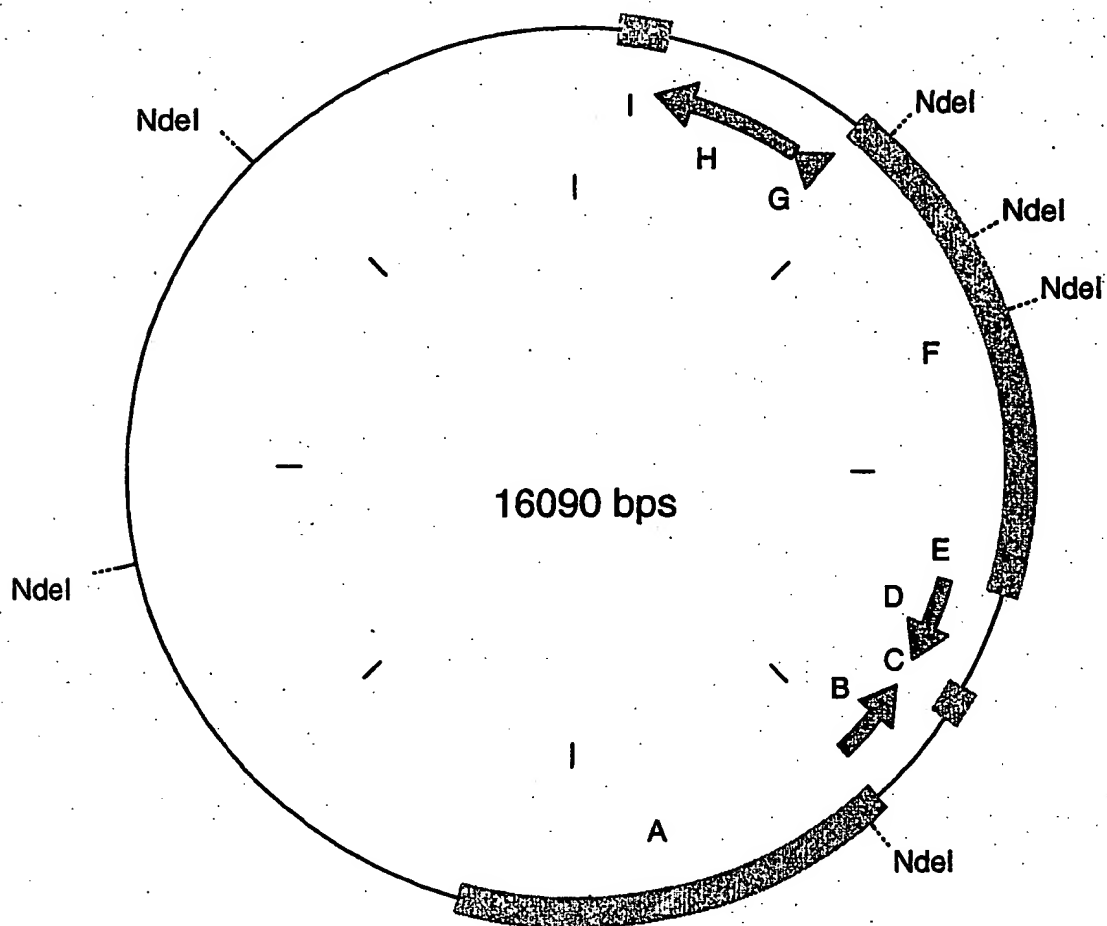


Abbildung 52:

pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-LeB4-IPP-SynMT1-nost

53/63

Abbildung 53:

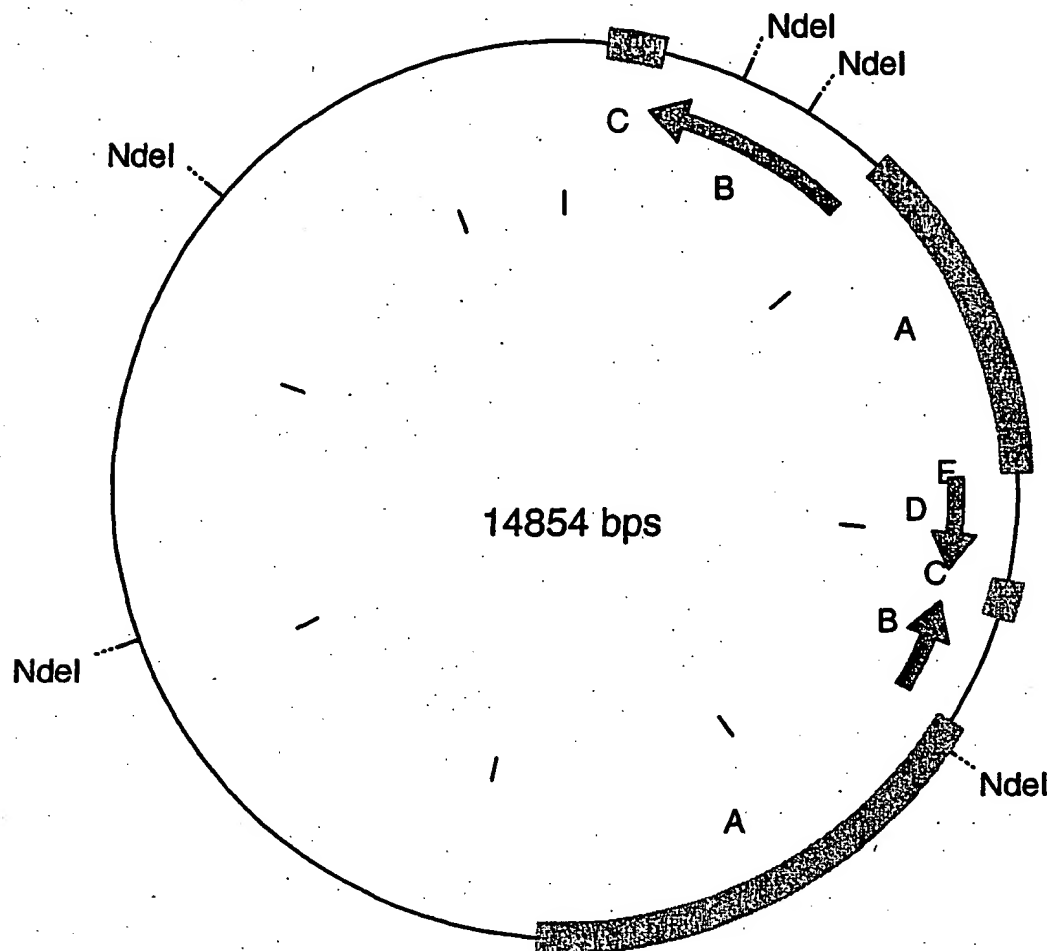
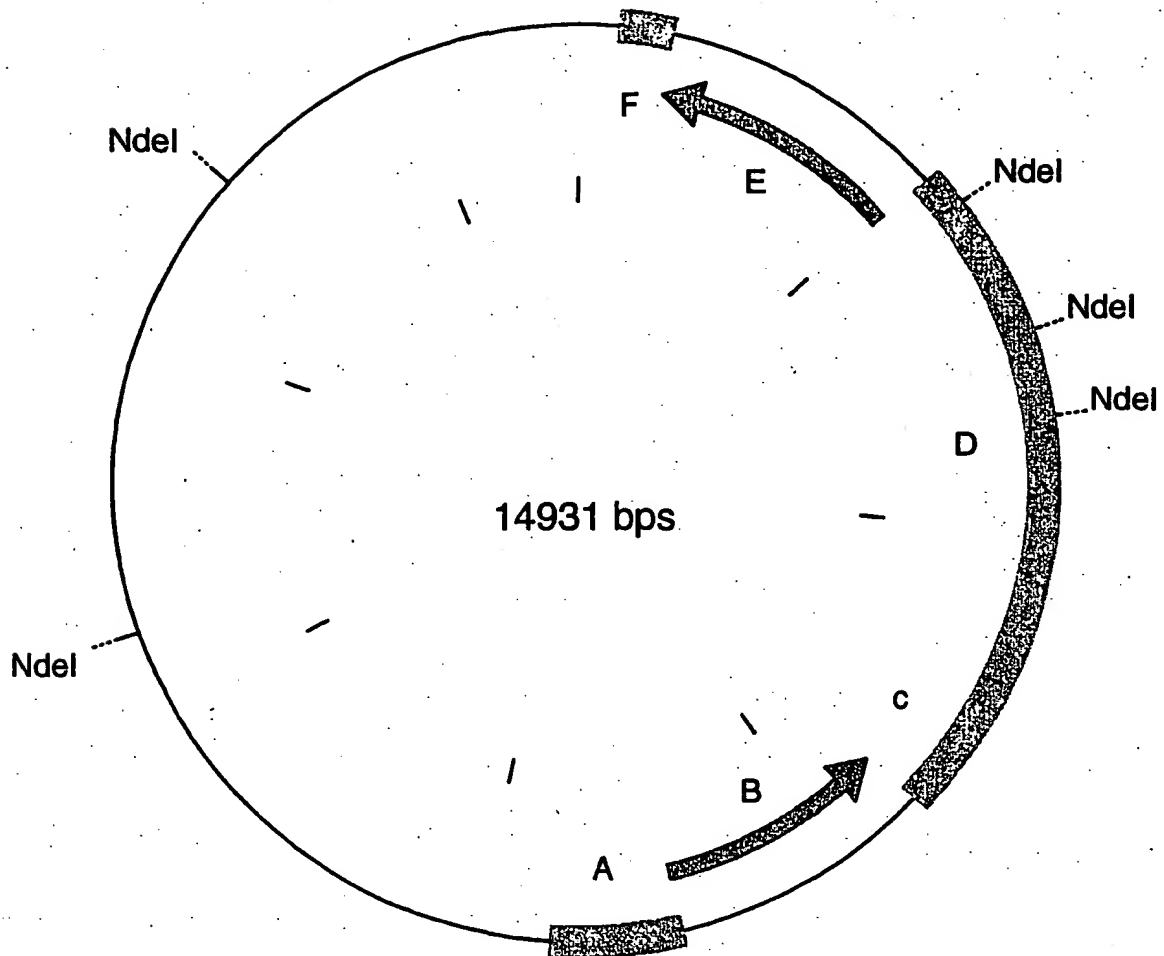
pSUN2-Pvic-*BnHGD-STLS1- α *BnHGD-ocsT-SBPP-At γ TMT-35sT

Abbildung 54: pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nost-USPP-AthHPPD-ocst



55/63

Abbildung 55: pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nost-USPP-AthHPT-ocst

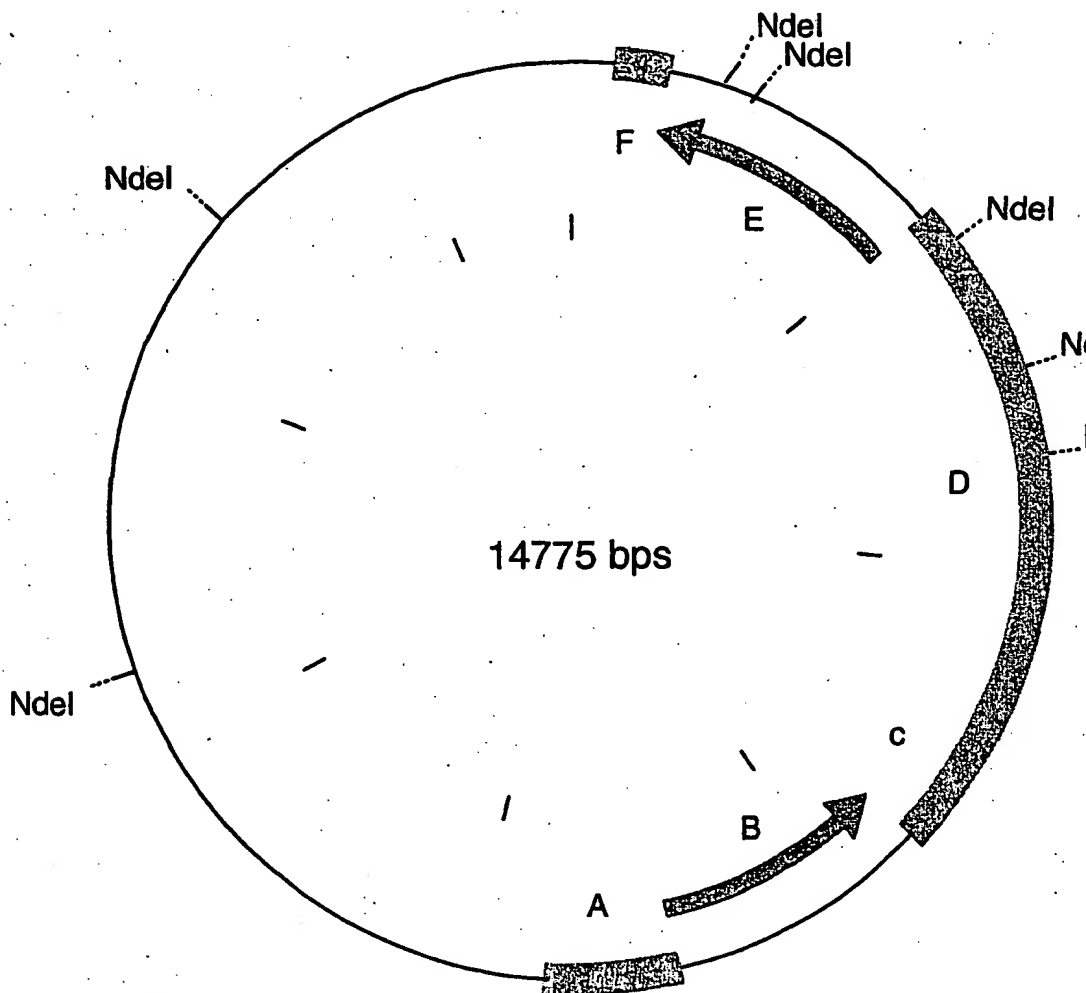


Abbildung 56:

pSUN2-SBPP-AtgTMT-35sT-USPP-AtHPPD-ocsT-LeB-SynMT1-nost

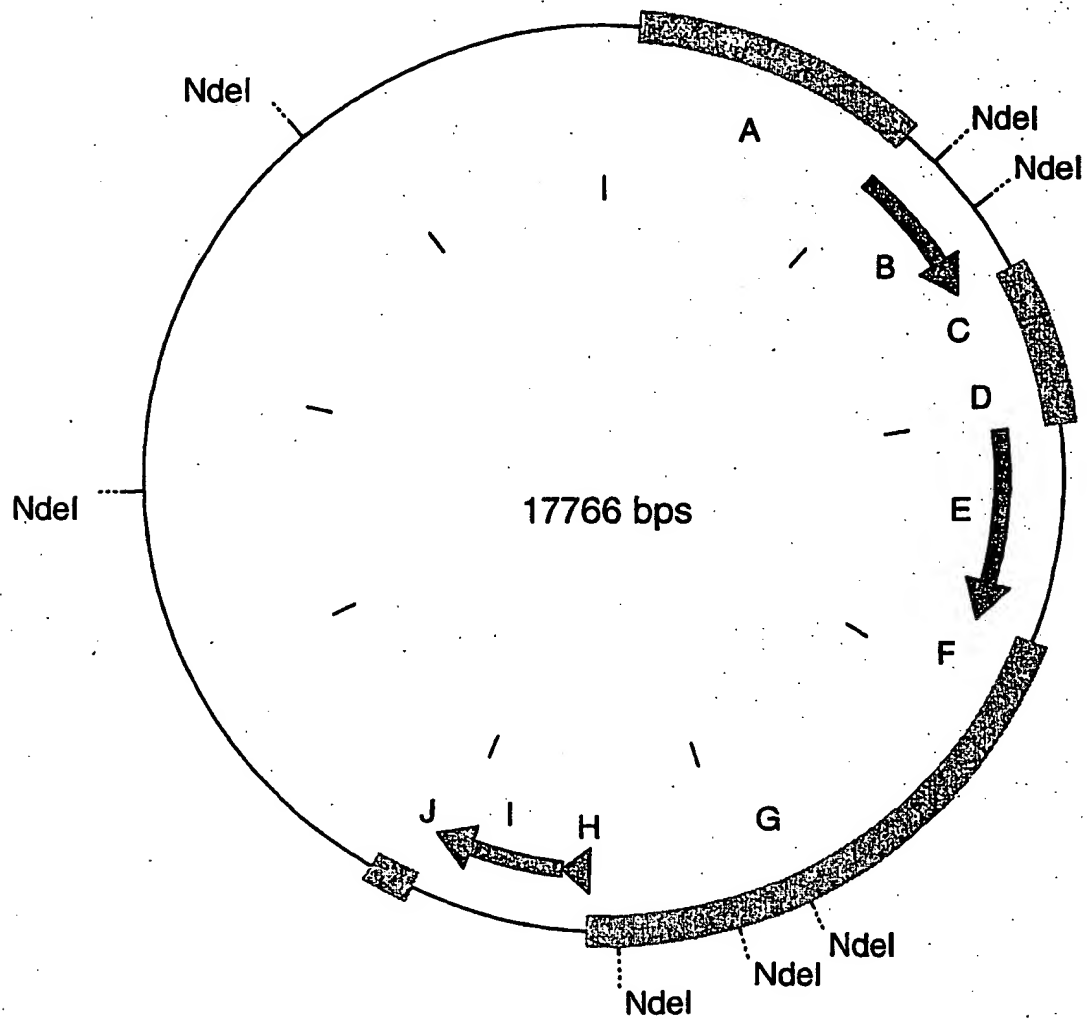
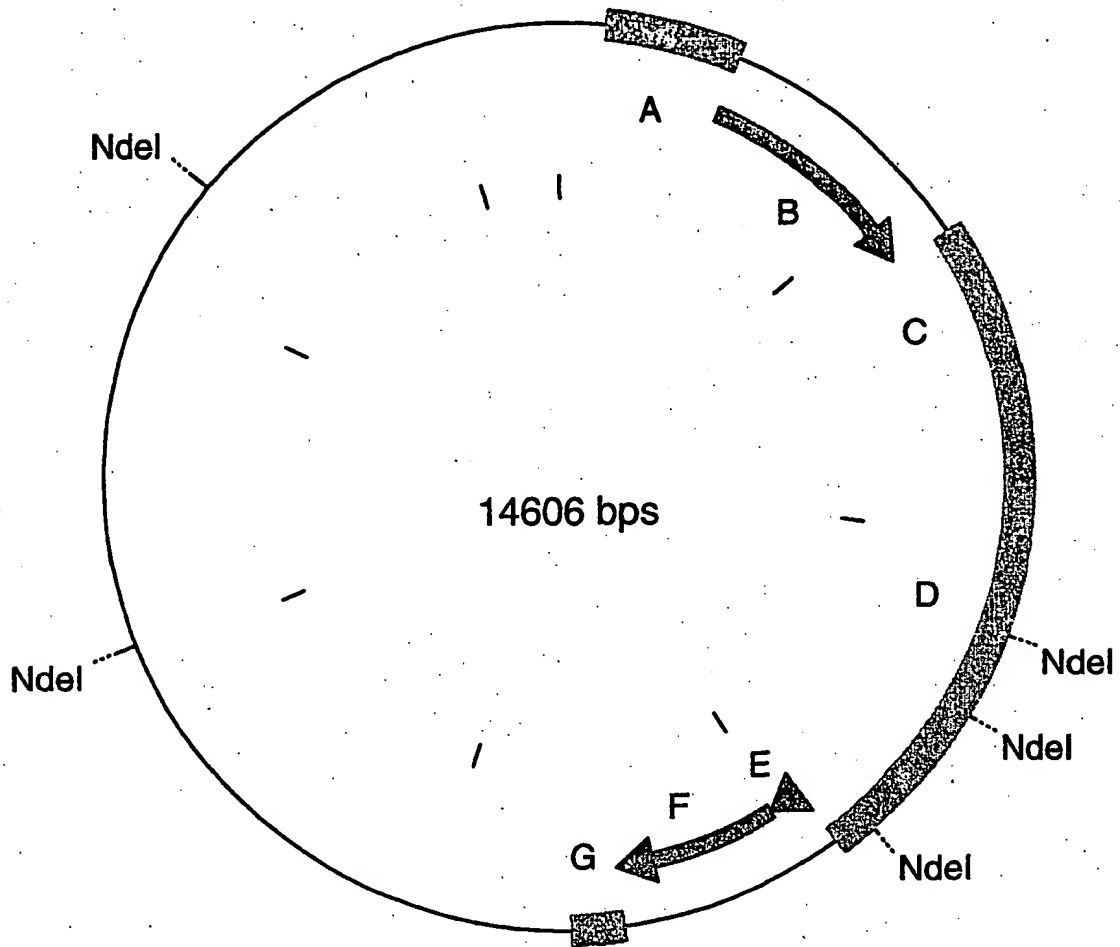


Abbildung 57:

pSUN2-USPP-AtHPPD-ocst-LeB-SynMT1-nost

58/63

Abbildung 58:

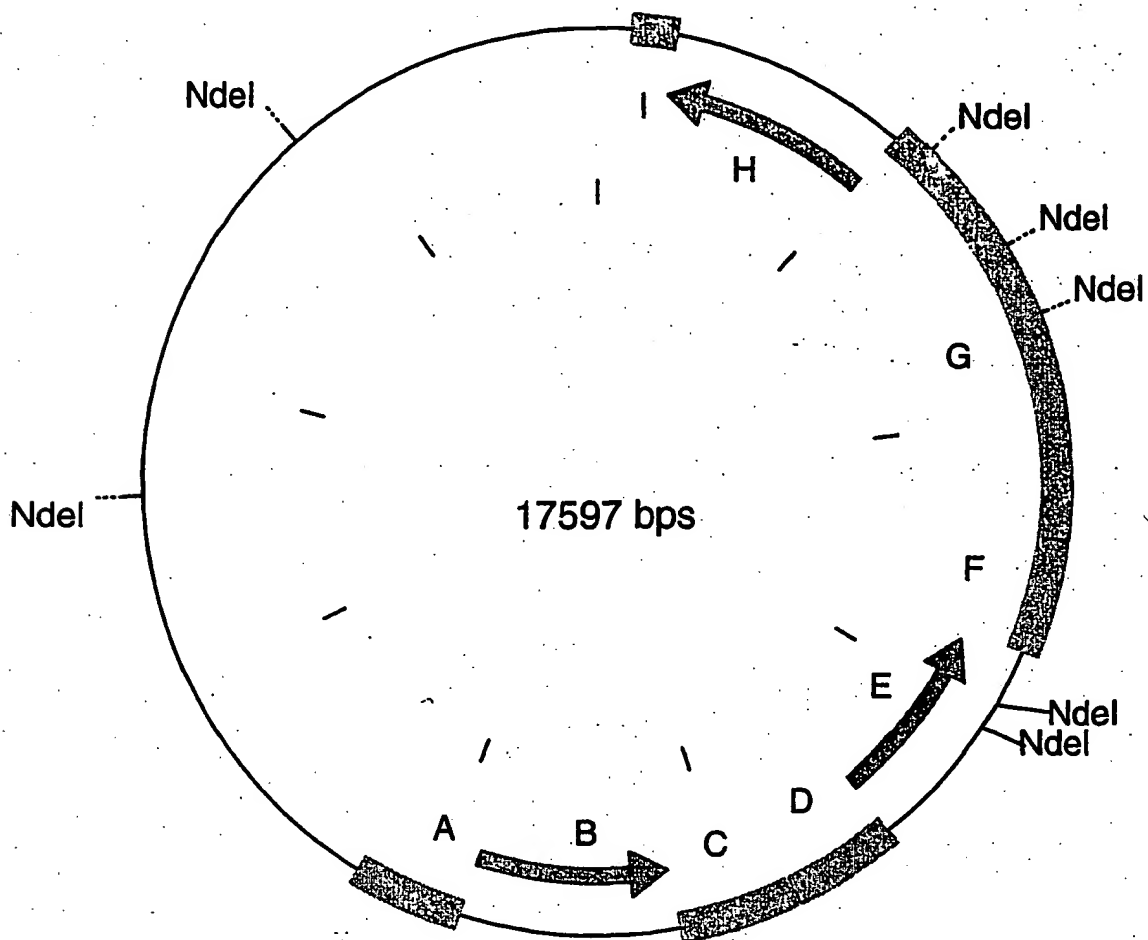
pSUN2-LeB4-NtGGPPOR-nosT-USPP-AtHPPD-ocsT-USPP-AtHPT-ocsT

Abbildung 59:

psUN2-SBP-AtyTMT-35sT-LeB4-IPP-SynCyc-nosT-LeB4-IPP-SynMT1-nosT

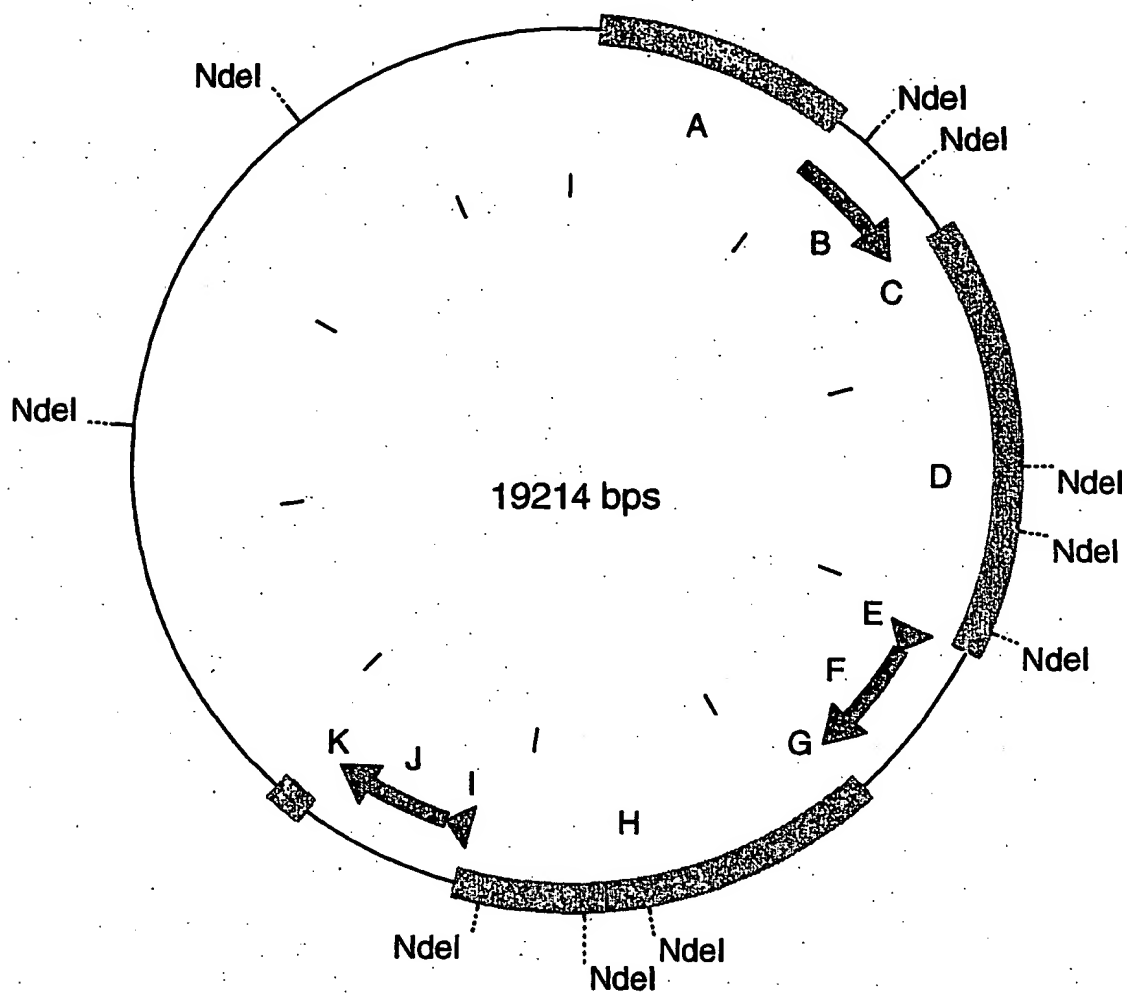


Abbildung 60

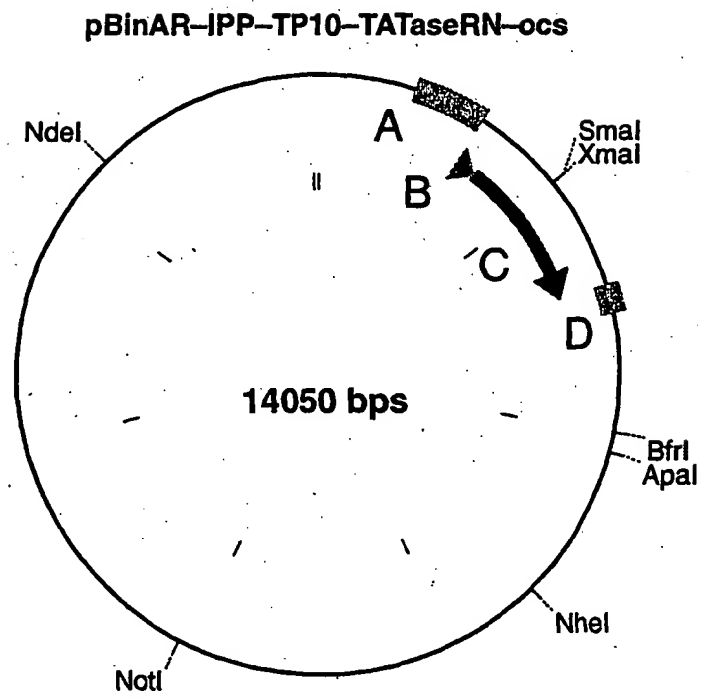
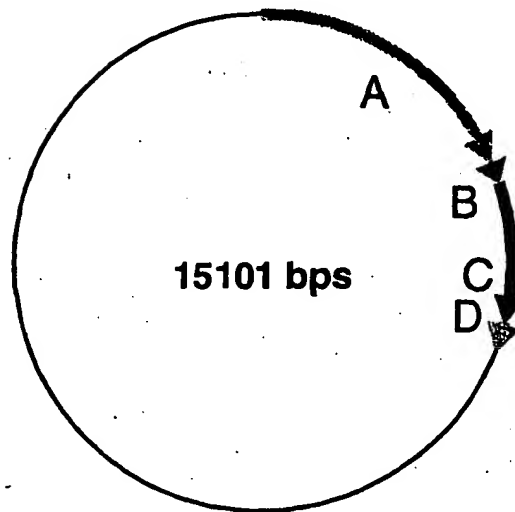


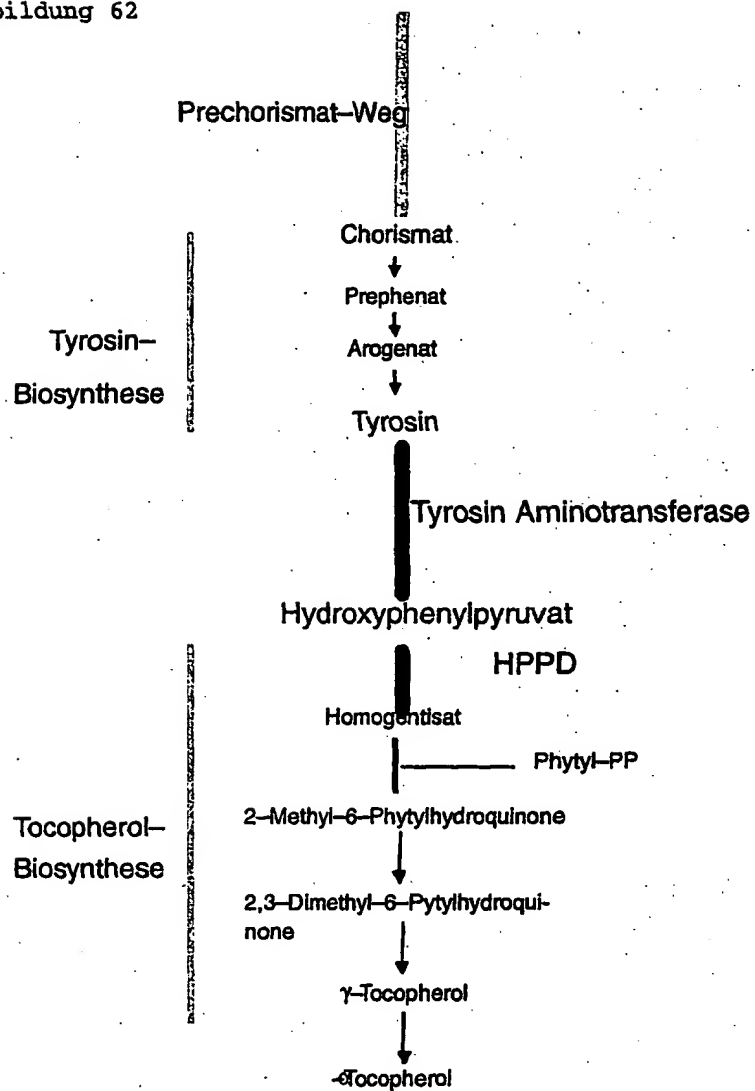
Abbildung 61:

pPTVkanLeP-IPPTp11-TATaseRN



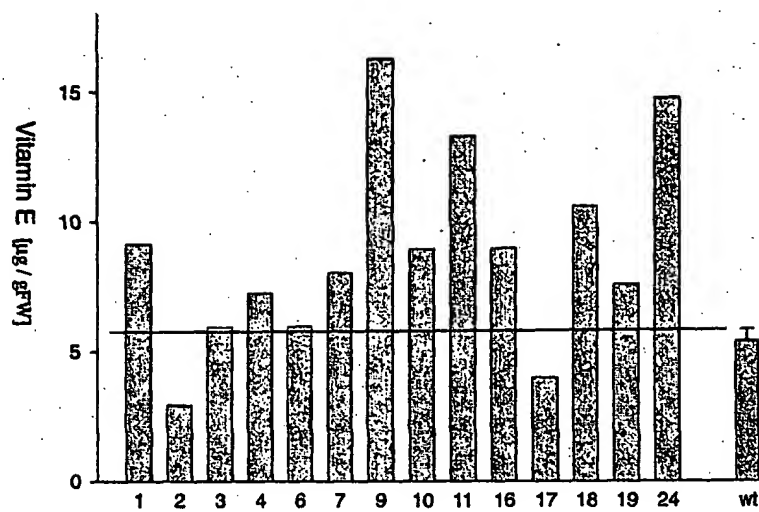
62/63

Abbildung 62



63/63

Abbildung 63



SEQUENZPROTOKOLL

<110> SunGene GmbH & Co. KGaA

<120> Erhöhung des Vitamin-E-Gehalts in Organismen durch Erhöhung der Tyrosinaminotransferase-Aktivität

<130> 0817/00021

<140>

<141>

<160> 58

<170> PatentIn Vers. 2.0

 $\langle 210 \rangle$ 1

.<211> 1377

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1371) .

<400> 1

gat atc atg gac tcc tac gtg att cag acg gat gtc gac gac agc ttg 48
Asp Ile Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu
1 5 10 15

tcc tca gtt ctg gat gtg cat gtc aat att ggt ggg aga aac tcg gta 96
Ser Ser Val Leu Asp Val His Val Asn Ile Gly Gly Arg Asn Ser Val
20 25 30

caa gga aga aag aaa ggc agg aag gcc aga tgg gac gtg aga ccc tct 144
Gln Gly Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser
35 40 45

gac atg tcc aat aag acc ttc aat ccc atc cga gcc atc gtg gac aac 192
Asp Met Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn
50 55 60

atg aag gtg cag ccc aat ccg aac aag acc gtg att tct ctg tca att 240
Met Lys Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile
65 70 75 80

ggg gac cct act gtg ttt ggg aac ctg cct aca gac cct gaa gtt acc 288
Gly Asp Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr
85 90 95

caa gcc atg aaa gat gcc ctg gac tgc ggg aag tac aat ggc tat gcc	336
Gln Ala Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala	
100 105 110	
ccg tcc atc ggc tac cta tcc agt cgg gag gag gtc gct tct tac tac	384
Pro Ser Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr	
115 120 125	
cac tgt cat gag gct cct ctg gaa gct aag gat gtc att ctg aca agc	432
His Cys His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser	
130 135 140	
ggc tgc agt cag gcc att gag cta tgt cta gct gtg ttg gcc aat cct	480
Gly Cys Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro	
145 150 155 160	
gga caa aac atc ctc att cca agg ccc ggg ttt tcc ctc tat agg act	528
Gly Gln Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr	
165 170 175	
ttg gct gag tct atg gga att gag gtc aag ctc tac aat ctc ctg cct	576
Leu Ala Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro	
180 185 190	
gag aag tct tgg gaa att gac cta aaa caa ctg gaa tct ctg atc gat	624
Glu Lys Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp	
195 200 205	
gaa aaa aca gcg tgt ctt gtt gtc aac aac cca tcc aat ccc tgt ggc	672
Glu Lys Thr Ala Cys Leu Val Val Asn Asn Pro Ser Asn Pro Cys Gly	
210 215 220	
tcc gtg ttc agt aag cga cac ctt cag aag att ttg gca gtg gct gaa	720
Ser Val Phe Ser Lys Arg His Leu Gln Lys Ile Leu Ala Val Ala Glu	
225 230 235 240	
agg cag tgt gtc ccc atc tta gct gac gag atc tat ggt gac atg gtg	768
Arg Gln Cys Val Pro Ile Leu Ala Asp Glu Ile Tyr Gly Asp Met Val	
245 250 255	
ttt tca gat tgc aaa tac gaa cca ctg gcc aac ctc agc acc aat gtt	816
Phe Ser Asp Cys Lys Tyr Glu Pro Leu Ala Asn Leu Ser Thr Asn Val	
260 265 270	
ccc atc ctg tcc tgt ggt ggg ctg gcc aag cgc tgg ctg gtt cct ggc	864
Pro Ile Leu Ser Cys Gly Gly Leu Ala Lys Arg Trp Leu Val Pro Gly	
275 280 285	
tgg agg ttg ggc tgg atc ctc att cat gat cga aga gac att ttt ggc	912
Trp Arg Leu Gly Trp Ile Leu Ile His Asp Arg Arg Asp Ile Phe Gly	

290	295	300	
aat gag att cga gac ggg ctg gtg aaa ctg agt cag cgg atc ctg gga			960
Asn Glu Ile Arg Asp Gly Leu Val Lys Leu Ser Gln Arg Ile Leu Gly			
305	310	315	320
cca tgc acc ata gtc cag ggt gct ctg aag agc atc ctt cag cga acc			1008
Pro Cys Thr Ile Val Gln Gly Ala Leu Lys Ser Ile Leu Gln Arg Thr			
325	330	335	
cct cag gag ttc tat cac gac acg tta agc ttc ctc aag tcc aat gcg			1056
Pro Gln Glu Phe Tyr His Asp Thr Leu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Ala			
340	345	350	
gac ctc tgc tat ggg gca ctg gct gcc atc cct gga ctc cag ccg gtc			1104
Asp Leu Cys Tyr Gly Ala Leu Ala Ala Ile Pro Gly Leu Gln Pro Val			
355	360	365	
cgc cct tct gga gcc atg tac ctt atg gtg gga att gag atg gag cat			1152
Arg Pro Ser Gly Ala Met Tyr Leu Met Val Gly Ile Glu Met Glu His			
370	375	380	
ttc ccg gaa ttc gag aac gac gtg gag ttc aca gag cgg ttg att gcg			1200
Phe Pro Glu Phe Glu Asn Asp Val Glu Phe Thr Glu Arg Leu Ile Ala			
385	390	395	400
gag cag gct gtc cac tgt ctc cca gca acg tgc ttc gag tac cca aat			1248
Glu Gln Ala Val His Cys Leu Pro Ala Thr Cys Phe Glu Tyr Pro Asn			
405	410	415	
ttc ttc cga gtg gtc atc aca gtc ccc gag gtg atg atg ctg gag gct			1296
Phe Phe Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala			
420	425	430	
tgt agc cgg atc cag gag ttc tgt gaa cag cac tac cac tgt gct gaa			1344
Cys Ser Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu			
435	440	445	
ggc agc cag gag gag tgt gac aaa taa gatatc			1377
Gly Ser Gln Glu Glu Cys Asp Lys			
450	455		

<210> 2

<211> 456

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

Asp Ile Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu

1	5	10	15
Ser Ser Val Leu Asp Val His Val Asn Ile Gly Gly Arg Asn Ser Val	20	25	30
Gln Gly Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser	35	40	45
Asp Met Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn	50	55	60
Met Lys Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile	65	70	75
Gly Asp Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr	85	90	95
Gln Ala Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala	100	105	110
Pro Ser Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr	115	120	125
His Cys His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser	130	135	140
Gly Cys Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro	145	150	155
Gly Gln Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr	165	170	175
Leu Ala Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro	180	185	190
Glu Lys Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp	195	200	205
Glu Lys Thr Ala Cys Leu Val Val Asn Asn Pro Ser Asn Pro Cys Gly	210	215	220
Ser Val Phe Ser Lys Arg His Leu Gln Lys Ile Leu Ala Val Ala Glu	225	230	235
Arg Gln Cys Val Pro Ile Leu Ala Asp Glu Ile Tyr Gly Asp Met Val	245	250	255
Phe Ser Asp Cys Lys Tyr Glu Pro Leu Ala Asn Leu Ser Thr Asn Val	260	265	270

Pro Ile Leu Ser Cys Gly Gly Leu Ala Lys Arg Trp Leu Val Pro Gly
 275 280 285

Trp Arg Leu Gly Trp Ile Leu Ile His Asp Arg Arg Asp Ile Phe Gly
 290 295 300

Asn Glu Ile Arg Asp Gly Leu Val Lys Leu Ser Gln Arg Ile Leu Gly
 305 310 315 320

Pro Cys Thr Ile Val Gln Gly Ala Leu Lys Ser Ile Leu Gln Arg Thr
 325 330 335

Pro Gln Glu Phe Tyr His Asp Thr Leu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Ala
 340 345 350

Asp Leu Cys Tyr Gly Ala Leu Ala Ala Ile Pro Gly Leu Gln Pro Val
 355 360 365

Arg Pro Ser Gly Ala Met Tyr Leu Met Val Gly Ile Glu Met Glu His
 370 375 380

Phe Pro Glu Phe Glu Asn Asp Val Glu Phe Thr Glu Arg Leu Ile Ala
 385 390 395 400

Glu Gln Ala Val His Cys Leu Pro Ala Thr Cys Phe Glu Tyr Pro Asn
 405 410 415

Phe Phe Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala
 420 425 430

Cys Ser Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu
 435 440 445

Gly Ser Gln Glu Glu Cys Asp Lys
 450 455

<210> 3

<211> 1365

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1365)

<400> 3

atg gac tcc tac gtg att cag acg gat gtc gac gac agc ttg tcc tca 48

Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu Ser Ser

1

5

10

15

gtt ctg gat gtg cgt gtc aat gtt ggt ggg aga aac tcg gta caa gga	96
Val Leu Asp Val Arg Val Asn Val Gly Gly Arg Asn Ser Val Gln Gly	
20 25 30	
aga aag aaa ggc agg aag gcc aga tgg gac gtg aga ccc tct gac atg	144
Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser Asp Met	
35 40 45	
tcc aat aag acc ttc aat ccc atc cga gcc atc gtg gac aac atg aag	192
Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn Met Lys	
50 55 60	
gtg cag ccc aat ccg aac aag acc gtg att tct ctg tca att ggg gac	240
Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile Gly Asp	
65 70 75 80	
cct act gtg ttt ggg aac ctg cct aca gac cct gaa gtt acc caa gcc	288
Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr Gln Ala	
85 90 95	
atg aaa gat gcc ctg gac tcg ggg aag tac aat ggc tat gcc ccg tcc	336
Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala Pro Ser	
100 105 110	
atc ggc tac cta tcc agt cgg gag gag gtc gct tct tac tac cac tgt	384
Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr His Cys	
115 120 125	
cat gag gct cct ctg gaa gct aag gat gtc att ctg aca agc ggc tgc	432
His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser Gly Cys	
130 135 140	
agt cag gcc att gag cta tgt cta gct gtg ttg gcc aat cct gga caa	480
Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro Gly Gln	
145 150 155 160	
aac atc ctc att cca agg ccc ggg ttt tcc ctc tat agg act ttg gct	528
Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ala	
165 170 175	
gag tct atg gga att gag gtc aag ctc tac aat ctc ctg ccc gag aag	576
Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro Glu Lys	
180 185 190	
tct tgg gaa att gac cta aaa caa ctg gaa tct ctg atc gat gaa aaa	624
Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp Glu Lys	
195 200 205	
aca gcg tgt ctt gtt gtc aac aac cca tcc aat ccc tgt ggc tcc gtg	672

Thr	Ala	Cys	Leu	Val	Val	Asn	Asn	Pro	Ser	Asn	Pro	Cys	Gly	Ser	Val		
210						215					220						
ttc	agt	aag	cgg	cac	ctt	cag	aag	att	ttg	gca	gtg	gct	gaa	agg	cag	720	
Phe	Ser	Lys	Arg	His	Leu	Gln	Lys	Ile	Leu	Ala	Val	Ala	Glu	Arg	Gln		
225					230					235					240		
tgt	gtc	ccc	atc	tta	gct	gac	gag	atc	tat	ggg	gac	atg	gtg	ttt	tca	768	
Cys	Val	Pro	Ile	Leu	Ala	Asp	Glu	Ile	Tyr	Gly	Asp	Met	Val	Phe	Ser		
				245					250					255			
gac	tgc	aaa	tac	gaa	cca	ctg	gcc	aac	ctc	agc	acc	aat	gtt	ccc	atc	816	
Asp	Cys	Lys	Tyr	Glu	Pro	Leu	Ala	Asn	Leu	Ser	Thr	Asn	Val	Pro	Ile		
			260					265					270				
ctg	tcc	tgt	ggg	ctg	gcc	aag	cgc	tgg	ctg	gtt	cct	ggc	tgg	agg		864	
Leu	Ser	Cys	Gly	Gly	Leu	Ala	Lys	Arg	Trp	Leu	Val	Pro	Gly	Trp	Arg		
		275					280					285					
ttg	ggc	tgg	atc	ctc	att	cat	gat	cga	aga	gac	att	ttt	ggc	aat	gag	912	
Leu	Gly	Trp	Ile	Leu	Ile	His	Asp	Arg	Arg	Asp	Ile	Phe	Gly	Asn	Glu		
		290				295					300						
att	cga	gac	ggg	ctg	gtg	aaa	ctg	agt	cag	cgg	atc	ctg	gga	cca	tgc	960	
Ile	Arg	Asp	Gly	Leu	Val	Lys	Leu	Ser	Gln	Arg	Ile	Leu	Gly	Pro	Cys		
305					310					315					320		
acc	ata	gtc	cag	ggg	gct	ctg	aag	agc	atc	ctt	cag	cga	acc	cct	cag	1008	
Thr	Ile	Val	Gln	Gly	Ala	Leu	Lys	Ser	Ile	Leu	Gln	Arg	Thr	Pro	Gln		
				325					330					335			
gag	ttc	tat	cac	gac	acg	tta	agc	ttc	ctc	aag	tcc	aat	gcg	gac	ctc	1056	
Glu	Phe	Tyr	His	Asp	Thr	Leu	Ser	Phe	Leu	Lys	Ser	Asn	Ala	Asp	Leu		
			340					345					350				
tgc	tat	ggg	gca	ctg	gct	gcc	atc	cct	gga	ctc	cag	ccg	gtc	cgc	cct	1104	
Cys	Tyr	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Ile	Pro	Gly	Leu	Gln	Pro	Val	Arg	Pro		
		355				360						365					
tct	gga	gcc	atg	tac	ctt	atg	gtg	gga	att	gag	atg	gag	cat	ctc	ccg	1152	
Ser	Gly	Ala	Met	Tyr	Leu	Met	Val	Gly	Ile	Glu	Met	Glu	His	Leu	Pro		
		370				375					380						
gaa	ttc	gag	aac	gac	gtg	gag	ttc	aca	gag	cgg	ttg	att	gcg	gag	cag	1200	
Glu	Phe	Glu	Asn	Asp	Val	Glu	Phe	Thr	Glu	Arg	Leu	Ile	Ala	Glu	Gln		
385					390					395					400		
gct	gtc	cac	tgt	ctc	cca	gca	acg	tgc	ttc	gag	tac	cca	aat	ttc	ttc	1248	
Ala	Val	His	Cys	Leu	Pro	Ala	Thr	Cys	Phe	Glu	Tyr	Pro	Asn	Phe	Phe		
				405					410					415			

cga gtg gtc atc aca gtc ccc gag gtg atg atg ctg gag gct tgt agc 1296
 Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala Cys Ser
 420 425 430

cgg atc cag gag ttc tgt gaa cag cac tac cac tgt gct gaa ggc agc 1344
 Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu Gly Ser
 435 440 445

cag gag gag tgt gac aaa taa 1365
 Gln Glu Glu Cys Asp Lys
 450 455

<210> 4

<211> 454

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Met Asp Ser Tyr Val Ile Gln Thr Asp Val Asp Asp Ser Leu Ser Ser
 1 5 10 15

Val Leu Asp Val Arg Val Asn Val Gly Gly Arg Asn Ser Val Gln Gly
 20 25 30

Arg Lys Lys Gly Arg Lys Ala Arg Trp Asp Val Arg Pro Ser Asp Met
 35 40 45

Ser Asn Lys Thr Phe Asn Pro Ile Arg Ala Ile Val Asp Asn Met Lys
 50 55 60

Val Gln Pro Asn Pro Asn Lys Thr Val Ile Ser Leu Ser Ile Gly Asp
 65 70 75 80

Pro Thr Val Phe Gly Asn Leu Pro Thr Asp Pro Glu Val Thr Gln Ala
 85 90 95

Met Lys Asp Ala Leu Asp Ser Gly Lys Tyr Asn Gly Tyr Ala Pro Ser
 100 105 110

Ile Gly Tyr Leu Ser Ser Arg Glu Glu Val Ala Ser Tyr Tyr His Cys
 115 120 125

His Glu Ala Pro Leu Glu Ala Lys Asp Val Ile Leu Thr Ser Gly Cys
 130 135 140

Ser Gln Ala Ile Glu Leu Cys Leu Ala Val Leu Ala Asn Pro Gly Gln
 145 150 155 160

Asn Ile Leu Ile Pro Arg Pro Gly Phe Ser Leu Tyr Arg Thr Leu Ala
 165 170 175
 Glu Ser Met Gly Ile Glu Val Lys Leu Tyr Asn Leu Leu Pro Glu Lys
 180 185 190
 Ser Trp Glu Ile Asp Leu Lys Gln Leu Glu Ser Leu Ile Asp Glu Lys
 195 200 205
 Thr Ala Cys Leu Val Val Asn Asn Pro Ser Asn Pro Cys Gly Ser Val
 210 215 220
 Phe Ser Lys Arg His Leu Gln Lys Ile Leu Ala Val Ala Glu Arg Gln
 225 230 235 240
 Cys Val Pro Ile Leu Ala Asp Glu Ile Tyr Gly Asp Met Val Phe Ser
 245 250 255
 Asp Cys Lys Tyr Glu Pro Leu Ala Asn Leu Ser Thr Asn Val Pro Ile
 260 265 270
 Leu Ser Cys Gly Gly Leu Ala Lys Arg Trp Leu Val Pro Gly Trp Arg
 275 280 285
 Leu Gly Trp Ile Leu Ile His Asp Arg Arg Asp Ile Phe Gly Asn Glu
 290 295 300
 Ile Arg Asp Gly Leu Val Lys Leu Ser Gln Arg Ile Leu Gly Pro Cys
 305 310 315 320
 Thr Ile Val Gln Gly Ala Leu Lys Ser Ile Leu Gln Arg Thr Pro Gln
 325 330 335
 Glu Phe Tyr His Asp Thr Leu Ser Phe Leu Lys Ser Asn Ala Asp Leu
 340 345 350
 Cys Tyr Gly Ala Leu Ala Ala Ile Pro Gly Leu Gln Pro Val Arg Pro
 355 360 365
 Ser Gly Ala Met Tyr Leu Met Val Gly Ile Glu Met Glu His Leu Pro
 370 375 380
 Glu Phe Glu Asn Asp Val Glu Phe Thr Glu Arg Leu Ile Ala Glu Gln
 385 390 395 400
 Ala Val His Cys Leu Pro Ala Thr Cys Phe Glu Tyr Pro Asn Phe Phe
 405 410 415
 Arg Val Val Ile Thr Val Pro Glu Val Met Met Leu Glu Ala Cys Ser
 420 425 430

Arg Ile Gln Glu Phe Cys Glu Gln His Tyr His Cys Ala Glu Gly Ser
 435 440 445

Gln Glu Glu Cys Asp Lys
 450

<210> 5

<211> 1269

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1269)

<400> 5

atg gca acc ctt aag tgc att gat tgg caa ttc agc gga agc gag gcg 48
 Met Ala Thr Leu Lys Cys Ile Asp Trp Gln Phe Ser Gly Ser Glu Ala
 1 5 10 15

gcc aaa gat gct gct gcg gcc tcc tta ggc tca tat acc tct gca ctc 96
 Ala Lys Asp Ala Ala Ala Ala Ser Leu Gly Ser Tyr Thr Ser Ala Leu
 20 25 30

tat gcc ctg tgc gat cct cat ggc aaa ccc att ttg ccc cca cga aat 144
 Tyr Ala Leu Cys Asp Pro His Gly Lys Pro Ile Leu Pro Pro Arg Asn
 35 40 45

gag atc ctg gag acc agc aat aca gcc gaa aaa gca gtt gtt aaa gct 192
 Glu Ile Leu Glu Thr Ser Asn Thr Ala Glu Lys Ala Val Val Lys Ala
 50 55 60

gtt ctt tat ggc tcg gga aac gcc tat gct cct agc tta ggc ctc gcg 240
 Val Leu Tyr Gly Ser Gly Asn Ala Tyr Ala Pro Ser Leu Gly Leu Ala
 65 70 75 80

gcc gcc aaa agt gcc gta gca gag tat cta aac caa ggt ctt cca aag 288
 Ala Ala Lys Ser Ala Val Ala Glu Tyr Leu Asn Gln Gly Leu Pro Lys
 85 90 95

aag ctt acc gca gat gac gtg ttt atg act ctg gga tgc aaa caa gct 336
 Lys Leu Thr Ala Asp Asp Val Phe Met Thr Leu Gly Cys Lys Gln Ala
 100 105 110

att gag ctc gcg gta gac att ctc gct aaa ccg aaa gcc aac gtt ttg 384
 Ile Glu Leu Ala Val Asp Ile Leu Ala Lys Pro Lys Ala Asn Val Leu
 115 120 125

ctt ccg agt ccc ggc ttc cca tgg gac cta gtc cgc tcc atc tac aag 432
 Leu Pro Ser Pro Gly Phe Pro Trp Asp Leu Val Arg Ser Ile Tyr Lys
 130 135 140

aac ctt gag gtc cgc cac tat aat ttc ctt cca gaa aag aac ttt gaa 480
 Asn Leu Glu Val Arg His Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Lys Asn Phe Glu
 145 150 155 160

atc gac ttt gat agc gtc cga gcg ctc gtg gac gag aac aca ttt gcc 528
 Ile Asp Phe Asp Ser Val Arg Ala Leu Val Asp Glu Asn Thr Phe Ala
 165 170 175

ata ttt ata atc aac ccc cac aac ccc aat ggt aac acc tac tcc gag 576
 Ile Phe Ile Ile Asn Pro His Asn Pro Asn Gly Asn Thr Tyr Ser Glu
 180 185 190

gct cat ctc aaa cag ctg gct gaa ctg gct aag gaa ctc aag att atg 624
 Ala His Leu Lys Gln Leu Ala Glu Leu Ala Lys Glu Leu Lys Ile Met
 195 200 205

gtg gtt tct gac gag gtt ttt aga tgg aca ctc ttt ggt agt aac cct 672
 Val Val Ser Asp Glu Val Phe Arg Trp Thr Leu Phe Gly Ser Asn Pro
 210 215 220

ttt gtt cct atg gga aaa ttc tcg tcg atc gta cca gtg gtt aca ctc 720
 Phe Val Pro Met Gly Lys Phe Ser Ser Ile Val Pro Val Val Thr Leu
 225 230 235 240

gga tcc ata tca aag gga tgg aaa gtc cca gga tgg cga act ggt tgg 768
 Gly Ser Ile Ser Lys Gly Trp Lys Val Pro Gly Trp Arg Thr Gly Trp
 245 250 255

ctc acg cta cat gat cta gac ggt gtc ttc aga aac acc aag gtc tta 816
 Leu Thr Leu His Asp Leu Asp Gly Val Phe Arg Asn Thr Lys Val Leu
 260 265 270

caa gct gct caa gat ttt ctc cag ata aac aat aac cct ccg aca gtt 864
 Gln Ala Ala Gln Asp Phe Leu Gln Ile Asn Asn Asn Pro Pro Thr Val
 275 280 285

atc cag gcg gct att cct gac atc ttg gag aaa act cct caa gag ttt 912
 Ile Gln Ala Ala Ile Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Gln Glu Phe
 290 295 300

ttt gat aag agg cag agt ttt ctg aaa gat aaa gta gaa ttt ggt tat 960
 Phe Asp Lys Arg Gln Ser Phe Leu Lys Asp Lys Val Glu Phe Gly Tyr
 305 310 315 320

tct aag ctc aag tac att cct agc ctc act tgc tac atg aaa ccc gaa 1008
 Ser Lys Leu Lys Tyr Ile Pro Ser Leu Thr Cys Tyr Met Lys Pro Glu

325	330	335	
gcc tgc acc ttc tta tgg acc gag ctt gat tta tgc agc ttt gtg gac			1056
Ala Cys Thr Phe Leu Trp Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Phe Val Asp			
340	345	350	
atc gaa gac gat caa gac ttt tgc aat aag ctt gct aaa gaa gaa aac			1104
Ile Glu Asp Asp Gln Asp Phe Cys Asn Lys Leu Ala Lys Glu Glu Asn			
355	360	365	
ctc gtc gtt tta cca ggg att gca ttc agt cag aag aac tgg ttg agg			1152
Leu Val Val Leu Pro Gly Ile Ala Phe Ser Gln Lys Asn Trp Leu Arg			
370	375	380	
cat tct atc gat atg gag act ccg gta ttg gag gat gca ttg gaa aga			1200
His Ser Ile Asp Met Glu Thr Pro Val Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg			
385	390	395	400
ttg aag agc ttc tgc gat cgc cat tcc aac aaa aaa gct ccc ctc aaa			1248
Leu Lys Ser Phe Cys Asp Arg His Ser Asn Lys Lys Ala Pro Leu Lys			
405	410	415	
gac gtc aat ggt gtt aag taa			1269
Asp Val Asn Gly Val Lys			
420			

<210> 6

<211> 422

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met	Ala	Thr	Leu	Lys	Cys	Ile	Asp	Trp	Gln	Phe	Ser	Gly	Ser	Glu	Ala
1				5					10					15	

Ala	Lys	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Leu	Gly	Ser	Tyr	Thr	Ser	Ala	Leu
			20						25					30	

Tyr	Ala	Leu	Cys	Asp	Pro	His	Gly	Lys	Pro	Ile	Leu	Pro	Pro	Arg	Asn
			35					40					45		

Glu	Ile	Leu	Glu	Thr	Ser	Asn	Thr	Ala	Glu	Lys	Ala	Val	Val	Lys	Ala
	50						55				60				

Val	Leu	Tyr	Gly	Ser	Gly	Asn	Ala	Tyr	Ala	Pro	Ser	Leu	Gly	Leu	Ala
	65					70				75				80	

Ala	Ala	Lys	Ser	Ala	Val	Ala	Glu	Tyr	Leu	Asn	Gln	Gly	Leu	Pro	Lys
						85				90				95	

Lys Leu Thr Ala Asp Asp Val Phe Met Thr Leu Gly Cys Lys Gln Ala
 100 105 110
 Ile Glu Leu Ala Val Asp Ile Leu Ala Lys Pro Lys Ala Asn Val Leu
 115 120 125
 Leu Pro Ser Pro Gly Phe Pro Trp Asp Leu Val Arg Ser Ile Tyr Lys
 130 135 140
 Asn Leu Glu Val Arg His Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Lys Asn Phe Glu
 145 150 155 160
 Ile Asp Phe Asp Ser Val Arg Ala Leu Val Asp Glu Asn Thr Phe Ala
 165 170 175
 Ile Phe Ile Ile Asn Pro His Asn Pro Asn Gly Asn Thr Tyr Ser Glu
 180 185 190
 Ala His Leu Lys Gln Leu Ala Glu Leu Ala Lys Glu Leu Lys Ile Met
 195 200 205
 Val Val Ser Asp Glu Val Phe Arg Trp Thr Leu Phe Gly Ser Asn Pro
 210 215 220
 Phe Val Pro Met Gly Lys Phe Ser Ser Ile Val Pro Val Val Thr Leu
 225 230 235 240
 Gly Ser Ile Ser Lys Gly Trp Lys Val Pro Gly Trp Arg Thr Gly Trp
 245 250 255
 Leu Thr Leu His Asp Leu Asp Gly Val Phe Arg Asn Thr Lys Val Leu
 260 265 270
 Gln Ala Ala Gln Asp Phe Leu Gln Ile Asn Asn Asn Pro Pro Thr Val
 275 280 285
 Ile Gln Ala Ala Ile Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Gln Glu Phe
 290 295 300
 Phe Asp Lys Arg Gln Ser Phe Leu Lys Asp Lys Val Glu Phe Gly Tyr
 305 310 315 320
 Ser Lys Leu Lys Tyr Ile Pro Ser Leu Thr Cys Tyr Met Lys Pro Glu
 325 330 335
 Ala Cys Thr Phe Leu Trp Thr Glu Leu Asp Leu Ser Ser Phe Val Asp
 340 345 350
 Ile Glu Asp Asp Gln Asp Phe Cys Asn Lys Leu Ala Lys Glu Glu Asn

355 360 365
 Leu Val Val Leu Pro Gly Ile Ala Phe Ser Gln Lys Asn Trp Leu Arg
 370 375 380
 His Ser Ile Asp Met Glu Thr Pro Val Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg
 385 390 395 400
 Leu Lys Ser Phe Cys Asp Arg His Ser Asn Lys Lys Ala Pro Leu Lys
 405 410 415
 Asp Val Asn Gly Val Lys
 420

<210> 7

<211> 1334

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1332)

<400> 7

atg gcg agc aac gga gtt acc aac tgt aac gca aac gcc aat gtt tgg 48
 Met Ala Ser Asn Gly Val Thr Asn Cys Asn Ala Asn Ala Asn Val Trp
 1 5 10 15

cgg ttc aaa gga aac ggt gca acg agt gat gcg acg gcg gtg acg ttg 96
 Arg Phe Lys Gly Asn Gly Ala Thr Ser Asp Ala Thr Ala Val Thr Leu
 20 25 30

aga aag ctt gct ttt ggg atg ttt aaa aac tgc acc atg aac agt gga 144
 Arg Lys Leu Ala Phe Gly Met Phe Lys Asn Cys Thr Met Asn Ser Gly
 35 40 45

aag acc att ttg ttc cca act ccc ggc gag ccc tcc gcc cat tcc aac 192
 Lys Thr Ile Leu Phe Pro Thr Pro Gly Glu Pro Ser Ala His Ser Asn
 50 55 60

ttc agg act tgc ccg gaa gcc gag gaa gcc gtt gcc gac gct gca cgc 240
 Phe Arg Thr Cys Pro Glu Ala Glu Glu Ala Val Ala Asp Ala Ala Arg
 65 70 75 80

tcc ggc atg gct aac tct tac gca ccc agc cct gga gtt ttc aag gct 288
 Ser Gly Met Ala Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Pro Gly Val Phe Lys Ala
 85 90 95

aga agg gcg gtg gct gaa tat tta aac gga gaa ctt ccg acg aag ctg 336

Arg Arg Ala Val Ala Glu Tyr Leu Asn Gly Glu Leu Pro Thr Lys Leu	
100 105 110	
aag gcc gag gat gtg tat atc acc gga gga tgt aac caa gcc ata gag	384
Lys Ala Glu Asp Val Tyr Ile Thr Gly Gly Cys Asn Gln Ala Ile Glu	
115 120 125	
atc gtg ata gat tct ctt gcc gga aat cca tcc acc aac att cta ctt	432
Ile Val Ile Asp Ser Leu Ala Gly Asn Pro Ser Thr Asn Ile Leu Leu	
130 135 140	
cca agg ccg ggg tat cct cac tac gat gct cgt gct gtc tat agc ggc	480
Pro Arg Pro Gly Tyr Pro His Tyr Asp Ala Arg Ala Val Tyr Ser Gly	
145 150 155 160	
ctc gag att cgc gaa tac gat ctt ctc ccc gag agt gat tgg gaa atc	528
Leu Glu Ile Arg Glu Tyr Asp Leu Leu Pro Glu Ser Asp Trp Glu Ile	
165 170 175	
aat ctc gat ggc ctc gag gcg gct gcg gat gag aat acc gtc gca atg	576
Asn Leu Asp Gly Leu Glu Ala Ala Ala Asp Glu Asn Thr Val Ala Met	
180 185 190	
gta atc atc aac ccc aac aat cca tgt gga aac gtc tac acc tac gac	624
Val Ile Ile Asn Pro Asn Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Thr Tyr Asp	
195 200 205	
cat ctc aac aag gtc gcg gag atg gct aga aaa ctc ggt ata atg ata	672
His Leu Asn Lys Val Ala Glu Met Ala Arg Lys Leu Gly Ile Met Ile	
210 215 220	
ata tcc gac gaa gta tat gat cat gtt gta tat gga gac aag cct ttt	720
Ile Ser Asp Glu Val Tyr Asp His Val Val Tyr Gly Asp Lys Pro Phe	
225 230 235 240	
att ccc atg ggg aag ttt gca tca ata gct ccg gtg atc acg ctc gga	768
Ile Pro Met Gly Lys Phe Ala Ser Ile Ala Pro Val Ile Thr Leu Gly	
245 250 255	
tcc ata tcc aaa gga tgg gtc aac cca ggc tgg aga gtt ggc tgg atc	816
Ser Ile Ser Lys Gly Trp Val Asn Pro Gly Trp Arg Val Gly Trp Ile	
260 265 270	
gcc atg aac gat cct aat ggt atc ttt gta tct aca ggg gta gtt caa	864
Ala Met Asn Asp Pro Asn Gly Ile Phe Val Ser Thr Gly Val Val Gln	
275 280 285	
gca ata gag gat ttt ctt gat tta act cca cag cct tca ttt att ctc	912
Ala Ile Glu Asp Phe Leu Asp Leu Thr Pro Gln Pro Ser Phe Ile Leu	
290 295 300	

cag gaa gca ctt cct gat ata ttg gag aaa aca cct aaa gag ttc ttc 960
 Gln Glu Ala Leu Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Lys Glu Phe Phe
 305 310 315 320

 gag aag aag atc aaa gcc atg aga cgc aac gtc gag ctt tca tgt gag 1008
 Glu Lys Lys Ile Lys Ala Met Arg Arg Asn Val Glu Leu Ser Cys Glu
 325 330 335

 agg ctc aag gat att cct tgt ctc ttt tgt ccc aag aaa ccc gaa tct 1056
 Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Leu Phe Cys Pro Lys Lys Pro Glu Ser
 340 345 350

 tgt tct tat tta tgg ttg aag ctt gac aca tca atg ttg aat aat atc 1104
 Cys Ser Tyr Leu Trp Leu Lys Leu Asp Thr Ser Met Leu Asn Asn Ile
 355 360 365

 aaa aat gat ttt gat ttc tgc acg aag cta gtt agt gag gag agt ctt 1152
 Lys Asn Asp Phe Asp Phe Cys Thr Lys Leu Val Ser Glu Glu Ser Leu
 370 375 380

 atc ctt ata cca gga gtg gct cta ggg gca gag aat tgg gtg agg ata 1200
 Ile Leu Ile Pro Gly Val Ala Leu Gly Ala Glu Asn Trp Val Arg Ile
 385 390 395 400

 tcg ata gga acc gac gaa tca gtg gta caa gaa ata ttt gac aga cta 1248
 Ser Ile Gly Thr Asp Glu Ser Val Val Gln Glu Ile Phe Asp Arg Leu
 405 410 415

 aaa ggt ttc tat gat cgt cat gcc atc tcc aag gaa gct atc aaa ctc 1296
 Lys Gly Phe Tyr Asp Arg His Ala Ile Ser Lys Glu Ala Ile Lys Leu
 420 425 430

 agt ggc cat gcc att aac cag atc gtc gtc tct gtc aa 1334
 Ser Gly His Ala Ile Asn Gln Ile Val Val Ser Val
 435 440

<210> 8

<211> 444

<212> PRT

<213> *Arabidopsis thaliana*

<400> 8

Met Ala Ser Asn Gly Val Thr Asn Cys Asn Ala Asn Ala Asn Val Trp
 1 5 10 15

Arg Phe Lys Gly Asn Gly Ala Thr Ser Asp Ala Thr Ala Val Thr Leu
 20 25 30

Arg Lys Leu Ala Phe Gly Met Phe Lys Asn Cys Thr Met Asn Ser Gly
 35 40 45
 Lys Thr Ile Leu Phe Pro Thr Pro Gly Glu Pro Ser Ala His Ser Asn
 50 55 60
 Phe Arg Thr Cys Pro Glu Ala Glu Glu Ala Val Ala Asp Ala Ala Arg
 65 70 75 80
 Ser Gly Met Ala Asn Ser Tyr Ala Pro Ser Pro Gly Val Phe Lys Ala
 85 90 95
 Arg Arg Ala Val Ala Glu Tyr Leu Asn Gly Glu Leu Pro Thr Lys Leu
 100 105 110
 Lys Ala Glu Asp Val Tyr Ile Thr Gly Gly Cys Asn Gln Ala Ile Glu
 115 120 125
 Ile Val Ile Asp Ser Leu Ala Gly Asn Pro Ser Thr Asn Ile Leu Leu
 130 135 140
 Pro Arg Pro Gly Tyr Pro His Tyr Asp Ala Arg Ala Val Tyr Ser Gly
 145 150 155 160
 Leu Glu Ile Arg Glu Tyr Asp Leu Leu Pro Glu Ser Asp Trp Glu Ile
 165 170 175
 Asn Leu Asp Gly Leu Glu Ala Ala Ala Asp Glu Asn Thr Val Ala Met
 180 185 190
 Val Ile Ile Asn Pro Asn Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Thr Tyr Asp
 195 200 205
 His Leu Asn Lys Val Ala Glu Met Ala Arg Lys Leu Gly Ile Met Ile
 210 215 220
 Ile Ser Asp Glu Val Tyr Asp His Val Val Tyr Gly Asp Lys Pro Phe
 225 230 235 240
 Ile Pro Met Gly Lys Phe Ala Ser Ile Ala Pro Val Ile Thr Leu Gly
 245 250 255
 Ser Ile Ser Lys Gly Trp Val Asn Pro Gly Trp Arg Val Gly Trp Ile
 260 265 270
 Ala Met Asn Asp Pro Asn Gly Ile Phe Val Ser Thr Gly Val Val Gln
 275 280 285
 Ala Ile Glu Asp Phe Leu Asp Leu Thr Pro Gln Pro Ser Phe Ile Leu
 290 295 300

Gln Glu Ala Leu Pro Asp Ile Leu Glu Lys Thr Pro Lys Glu Phe Phe
 305 310 315 320

Glu Lys Lys Ile Lys Ala Met Arg Arg Asn Val Glu Leu Ser Cys Glu
 325 330 335

Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Leu Phe Cys Pro Lys Lys Pro Glu Ser
 340 345 350

Cys Ser Tyr Leu Trp Leu Lys Leu Asp Thr Ser Met Leu Asn Asn Ile
 355 360 365

Lys Asn Asp Phe Asp Phe Cys Thr Lys Leu Val Ser Glu Glu Ser Leu
 370 375 380

Ile Leu Ile Pro Gly Val Ala Leu Gly Ala Glu Asn Trp Val Arg Ile
 385 390 395 400

Ser Ile Gly Thr Asp Glu Ser Val Val Gln Glu Ile Phe Asp Arg Leu
 405 410 415

Lys Gly Phe Tyr Asp Arg His Ala Ile Ser Lys Glu Ala Ile Lys Leu
 420 425 430

Ser Gly His Ala Ile Asn Gln Ile Val Val Ser Val
 435 440

<210> 9

<211> 1389

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1389)

<400> 9

atg agc gaa gaa caa caa cac gcc aat cta gcg gtt ccc gcg ttt aaa 48
 Met Ser Glu Glu Gln Gln His Ala Asn Leu Ala Val Pro Ala Phe Lys
 1 5 10 15

act gag aaa gat ccc gta acg caa acg caa aat ggt caa agt agc gtt 96
 Thr Glu Lys Asp Pro Val Thr Gln Thr Gln Asn Gly Gln Ser Ser Val
 20 25 30

tgg cgt ttc ggt gga agt gat aag gca gcg aaa gca tcc acc gta acg 144
 Trp Arg Phe Gly Gly Ser Asp Lys Ala Ala Lys Ala Ser Thr Val Thr
 35 40 45

ctt aga ggt gtc atc tac atg ctc ttc gac aac tgc agc aaa gac gtc	192
Leu Arg Gly Val Ile Tyr Met Leu Phe Asp Asn Cys Ser Lys Asp Val	
50 55 60	
aat aag acc att tta ccc ctc ggc cac ggt gac cct tcc gtc tac cct	240
Asn Lys Thr Ile Leu Pro Leu Gly His Gly Asp Pro Ser Val Tyr Pro	
65 70 75 80	
tgc ttc cgt acc tgt atc gaa gct gaa gac gcc gtc gtc gac gtc ctt	288
Cys Phe Arg Thr Cys Ile Glu Ala Glu Asp Ala Val Val Asp Val Leu	
85 90 95	
cgc tcc ggc aaa ggc aat tct tac ggt ccc gga gct ggg att ctc ccc	336
Arg Ser Gly Lys Gly Asn Ser Tyr Gly Pro Gly Ala Gly Ile Leu Pro	
100 105 110	
gca aga cga gcc gtt gct gat tat atg aac cga gat ctt ccg cac aag	384
Ala Arg Arg Ala Val Ala Asp Tyr Met Asn Arg Asp Leu Pro His Lys	
115 120 125	
tta acg ccc gaa gat att ttt ctg acc gct gga tgc aac caa ggg ata	432
Leu Thr Pro Glu Asp Ile Phe Leu Thr Ala Gly Cys Asn Gln Gly Ile	
130 135 140	
gag atc gtg ttc gaa tcg ttg gct cga cca aac gca aac atc ttg ctc	480
Glu Ile Val Phe Glu Ser Leu Ala Arg Pro Asn Ala Asn Ile Leu Leu	
145 150 155 160	
cca cgt cct ggc ttc cct cat tac gac gct cgt gct gct tac agt ggt	528
Pro Arg Pro Gly Phe Pro His Tyr Asp Ala Arg Ala Ala Tyr Ser Gly	
165 170 175	
ctc gag gtt cgc aag ttt gat ctt ctt ccc gag aaa gaa tgg gag att	576
Leu Glu Val Arg Lys Phe Asp Leu Leu Pro Glu Lys Glu Trp Glu Ile	
180 185 190	
gat ctt gaa ggt atc gaa gcc att gca gac gag aaa act gtg gct atg	624
Asp Leu Glu Gly Ile Glu Ala Ile Ala Asp Glu Lys Thr Val Ala Met	
195 200 205	
gtt gta att aac ccc aac aat ccc tgt gga aat gtc tac tct cac gac	672
Val Val Ile Asn Pro Asn Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser His Asp	
210 215 220	
cat ctc aaa aag gtt gca gag acg gct agg aag ctc ggg ata atg gtg	720
His Leu Lys Lys Val Ala Glu Thr Ala Arg Lys Leu Gly Ile Met Val	
225 230 235 240	
atc tca gac gaa gta tat gac cga act ata ttc gga gac aat cca ttt	768

Ile Ser Asp Glu Val Tyr Asp Arg Thr Ile Phe Gly Asp Asn Pro Phe	
245 250 255	
ggt cca atg ggg aag ttt gct tcg ata gtc cct gta ttg aca cta gca	816
Val Pro Met Gly Lys Phe Ala Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Ala	
260 265 270	
ggc ata tct aag gga tgg gtt gtt cct gga tgg aaa att ggc tgg att	864
Gly Ile Ser Lys Gly Trp Val Val Pro Gly Trp Lys Ile Gly Trp Ile	
275 280 285	
gcc ttg aat gat ccc gag ggc gtt ttc gag acc acc aag gtg tta caa	912
Ala Leu Asn Asp Pro Glu Gly Val Phe Glu Thr Thr Lys Val Leu Gln	
290 295 300	
tcc atc aaa cag aat ctt gac gta act cct gac cct gcc aca ata att	960
Ser Ile Lys Gln Asn Leu Asp Val Thr Pro Asp Pro Ala Thr Ile Ile	
305 310 315 320	
cag gct gca ctt cca gcg atc ctg gag aaa gcg gac aaa aac ttc ttt	1008
Gln Ala Ala Leu Pro Ala Ile Leu Glu Lys Ala Asp Lys Asn Phe Phe	
325 330 335	
gca aag aag aac aag ata ctc aaa cat aat gtt gat ttg gtg tgt gat	1056
Ala Lys Lys Asn Lys Ile Leu Lys His Asn Val Asp Leu Val Cys Asp	
340 345 350	
agg ctc aag gac atc ccc tgt gtc gtc tgt ccc aag aaa cct gag tct	1104
Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Val Val Cys Pro Lys Lys Pro Glu Ser	
355 360 365	
tgc act tac tta ttg aca aag ttg gag ctg tca ctg atg gat aat atc	1152
Cys Thr Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Glu Leu Ser Leu Met Asp Asn Ile	
370 375 380	
aag gac gat ata gat ttt tgc gta aaa ctg gcc aga gag gag aat ctc	1200
Lys Asp Asp Ile Asp Phe Cys Val Lys Leu Ala Arg Glu Glu Asn Leu	
385 390 395 400	
gtg ttt cta cca ggg gat gct ctg ggt ttg aag aac tgg acg agg ata	1248
Val Phe Leu Pro Gly Asp Ala Leu Gly Leu Lys Asn Trp Thr Arg Ile	
405 410 415	
acc atc gga gtc gaa gct cat atg ctt gag gat gca ctt gag aga ctg	1296
Thr Ile Gly Val Glu Ala His Met Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg Leu	
420 425 430	
aag ggt ttc tgt aca cgt cat gcc aag aag aca gag aca gaa act gag	1344
Lys Gly Phe Cys Thr Arg His Ala Lys Lys Thr Glu Thr Glu Thr Glu	
435 440 445	

tca ctt caa gct ttg aaa ctg agt gat aat aat ctc gaa atg taa 1389
 Ser Leu Gln Ala Leu Lys Leu Ser Asp Asn Asn Leu Glu Met
 450 455 460

<210> 10

<211> 462

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

Met Ser Glu Glu Gln Gln His Ala Asn Leu Ala Val Pro Ala Phe Lys
 1 5 10 15

Thr Glu Lys Asp Pro Val Thr Gln Thr Gln Asn Gly Gln Ser Ser Val
 20 25 30

Trp Arg Phe Gly Gly Ser Asp Lys Ala Ala Lys Ala Ser Thr Val Thr
 35 40 45

Leu Arg Gly Val Ile Tyr Met Leu Phe Asp Asn Cys Ser Lys Asp Val
 50 55 60

Asn Lys Thr Ile Leu Pro Leu Gly His Gly Asp Pro Ser Val Tyr Pro
 65 70 75 80

Cys Phe Arg Thr Cys Ile Glu Ala Glu Asp Ala Val Val Asp Val Leu
 85 90 95

Arg Ser Gly Lys Gly Asn Ser Tyr Gly Pro Gly Ala Gly Ile Leu Pro
 100 105 110

Ala Arg Arg Ala Val Ala Asp Tyr Met Asn Arg Asp Leu Pro His Lys
 115 120 125

Leu Thr Pro Glu Asp Ile Phe Leu Thr Ala Gly Cys Asn Gln Gly Ile
 130 135 140

Glu Ile Val Phe Glu Ser Leu Ala Arg Pro Asn Ala Asn Ile Leu Leu
 145 150 155 160

Pro Arg Pro Gly Phe Pro His Tyr Asp Ala Arg Ala Ala Tyr Ser Gly
 165 170 175

Leu Glu Val Arg Lys Phe Asp Leu Leu Pro Glu Lys Glu Trp Glu Ile
 180 185 190

Asp Leu Glu Gly Ile Glu Ala Ile Ala Asp Glu Lys Thr Val Ala Met
 195 200 205

Val Val Ile Asn Pro Asn Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser His Asp
 210 215 220
 His Leu Lys Lys Val Ala Glu Thr Ala Arg Lys Leu Gly Ile Met Val
 225 230 235 240
 Ile Ser Asp Glu Val Tyr Asp Arg Thr Ile Phe Gly Asp Asn Pro Phe
 245 250 255
 Val Pro Met Gly Lys Phe Ala Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Ala
 260 265 270
 Gly Ile Ser Lys Gly Trp Val Val Pro Gly Trp Lys Ile Gly Trp Ile
 275 280 285
 Ala Leu Asn Asp Pro Glu Gly Val Phe Glu Thr Thr Lys Val Leu Gln
 290 295 300
 Ser Ile Lys Gln Asn Leu Asp Val Thr Pro Asp Pro Ala Thr Ile Ile
 305 310 315 320
 Gln Ala Ala Leu Pro Ala Ile Leu Glu Lys Ala Asp Lys Asn Phe Phe
 325 330 335
 Ala Lys Lys Asn Lys Ile Leu Lys His Asn Val Asp Leu Val Cys Asp
 340 345 350
 Arg Leu Lys Asp Ile Pro Cys Val Val Cys Pro Lys Lys Pro Glu Ser
 355 360 365
 Cys Thr Tyr Leu Leu Thr Lys Leu Glu Leu Ser Leu Met Asp Asn Ile
 370 375 380
 Lys Asp Asp Ile Asp Phe Cys Val Lys Leu Ala Arg Glu Glu Asn Leu
 385 390 395 400
 Val Phe Leu Pro Gly Asp Ala Leu Gly Leu Lys Asn Trp Thr Arg Ile
 405 410 415
 Thr Ile Gly Val Glu Ala His Met Leu Glu Asp Ala Leu Glu Arg Leu
 420 425 430
 Lys Gly Phe Cys Thr Arg His Ala Lys Lys Thr Glu Thr Glu Thr Glu
 435 440 445
 Ser Leu Gln Ala Leu Lys Leu Ser Asp Asn Asn Leu Glu Met
 450 455 460

<210> 11
 <211> 1243
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1242)

<400> 11
 atg gag aat gga gca acg acg acg agc aca att acc atc aaa ggg att 48
 Met Glu Asn Gly Ala Thr Thr Thr Ser Thr Ile Thr Ile Lys Gly Ile
 1 5 10 15
 ctg agt ttg cta atg gaa agc atc aca aca gag gaa gat gaa gga gga 96
 Leu Ser Leu Leu Met Glu Ser Ile Thr Thr Glu Glu Asp Glu Gly Gly
 20 25 30
 aag aga gta ata tct ctg gga atg gga gac cca aca ctc tac tcg tgt 144
 Lys Arg Val Ile Ser Leu Gly Met Gly Asp Pro Thr Leu Tyr Ser Cys
 35 40 45
 ttt cgt aca aca caa gtc tct ctt caa gct gtt tct gat tct ctt ctc 192
 Phe Arg Thr Thr Gln Val Ser Leu Gln Ala Val Ser Asp Ser Leu Leu
 50 55 60
 tcc aac aag ttc cat ggt tac tct cct acc gtc ggt ctt ccc caa gct 240
 Ser Asn Lys Phe His Gly Tyr Ser Pro Thr Val Gly Leu Pro Gln Ala
 65 70 75 80
 cga agg gca ata gca gag tat cta tcg cgt gat ctt cca tac aaa ctt 288
 Arg Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Leu Ser Arg Asp Leu Pro Tyr Lys Leu
 85 90 95
 tca cag gat gat gtg ttt atc aca tcg ggt tgc acg caa gcg atc gat 336
 Ser Gln Asp Asp Val Phe Ile Thr Ser Gly Cys Thr Gln Ala Ile Asp
 100 105 110
 gta gca ttg tcg atg tta gct cgt ccc agg gct aat ata ctt ctt cca 384
 Val Ala Leu Ser Met Leu Ala Arg Pro Arg Ala Asn Ile Leu Leu Pro
 115 120 125
 agg cct ggt ttc cca atc tat gaa ctc tgt gct aag ttt aga cac ctt 432
 Arg Pro Gly Phe Pro Ile Tyr Glu Leu Cys Ala Lys Phe Arg His Leu
 130 135 140
 gaa gtt cgc tac gtc gat ctt ctt ccg gaa aat gga tgg gag atc gat 480
 Glu Val Arg Tyr Val Asp Leu Leu Pro Glu Asn Gly Trp Glu Ile Asp
 145 150 155 160

ctt gat gct gtc gag gct ctt gca gac gaa aac acg gtt gct ttg gtt	528
Leu Asp Ala Val Glu Ala Leu Ala Asp Glu Asn Thr Val Ala Leu Val	
165 170 175	
ggt ata aac cct ggt aat cct tgc ggg aat gtc tat agc tac cag cat	576
Val Ile Asn Pro Gly Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser Tyr Gln His	
180 185 190	
ttg atg aag att gcg gaa tcg gcg aaa aaa cta ggg ttt ctt gtg att	624
Leu Met Lys Ile Ala Glu Ser Ala Lys Lys Leu Gly Phe Leu Val Ile	
195 200 205	
gct gat gag gtt tac ggt cat ctt gct ttt ggt agc aaa ccg ttt gtg	672
Ala Asp Glu Val Tyr Gly His Leu Ala Phe Gly Ser Lys Pro Phe Val	
210 215 220	
cca atg ggt gtg ttt gga tct att gtt cct gtg ctt act ctt ggc tct	720
Pro Met Gly Val Phe Gly Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Gly Ser	
225 230 235 240	
tta tca aag aga tgg ata gtt cca ggt tgg cga ctc ggg tgg ttt gtc	768
Leu Ser Lys Arg Trp Ile Val Pro Gly Trp Arg Leu Gly Trp Phe Val	
245 250 255	
acc act gat cct tct ggt tcc ttt aag gac cct aag atc att gag agg	816
Thr Thr Asp Pro Ser Gly Ser Phe Lys Asp Pro Lys Ile Ile Glu Arg	
260 265 270	
ttt aag aaa tac ttt gat att ctt ggt gga cca gct aca ttt att cag	864
Phe Lys Lys Tyr Phe Asp Ile Leu Gly Gly Pro Ala Thr Phe Ile Gln	
275 280 285	
gct gca gtt ccc act att ttg gaa cag acg gat gag tct ttc ttc aag	912
Ala Ala Val Pro Thr Ile Leu Glu Gln Thr Asp Glu Ser Phe Phe Lys	
290 295 300	
aaa acc ttg aac tcg ttg aag aac tct tcg gat att tgt tgt gac tgg	960
Lys Thr Leu Asn Ser Leu Lys Asn Ser Ser Asp Ile Cys Cys Asp Trp	
305 310 315 320	
atc aag gag att cct tgc att gat tcc tcg cat cga cca gaa gga tcc	1008
Ile Lys Glu Ile Pro Cys Ile Asp Ser Ser His Arg Pro Glu Gly Ser	
325 330 335	
atg gca atg atg gtc aag ctg aat ctc tca tta ctt gaa gat gta agt	1056
Met Ala Met Met Val Lys Leu Asn Leu Ser Leu Leu Glu Asp Val Ser	
340 345 350	
gac gat atc gac ttc tgt ttc aag tta gct agg gaa gaa tca gtc atc	1104
Asp Asp Ile Asp Phe Cys Phe Lys Leu Ala Arg Glu Glu Ser Val Ile	

355 360 365
 ctt ctt cct ggt acc gcg gtg ggg ctg aag aac tgg ctg agg ata acg 1152
 Leu Leu Pro Gly Thr Ala Val Gly Leu Lys Asn Trp Leu Arg Ile Thr
 370 375 380

 ttt gca gca gat gca act tcg att gaa gaa gct ttt aaa agg atc aaa 1200
 Phe Ala Ala Asp Ala Thr Ser Ile Glu Glu Ala Phe Lys Arg Ile Lys
 385 390 395 400

 tgt ttc tat ctt aga cat gcc aag act caa tat cca acc ata t 1243
 Cys Phe Tyr Leu Arg His Ala Lys Thr Gln Tyr Pro Thr Ile
 405 410

 <210> 12
 <211> 414
 <212> PRT
 <213> Arabidopsis thaliana

 <400> 12
 Met Glu Asn Gly Ala Thr Thr Thr Ser Thr Ile Thr Ile Lys Gly Ile
 1 5 10 15

 Leu Ser Leu Leu Met Glu Ser Ile Thr Thr Glu Glu Asp Glu Gly Gly
 20 25 30

 Lys Arg Val Ile Ser Leu Gly Met Gly Asp Pro Thr Leu Tyr Ser Cys
 35 40 45

 Phe Arg Thr Thr Gln Val Ser Leu Gln Ala Val Ser Asp Ser Leu Leu
 50 55 60

 Ser Asn Lys Phe His Gly Tyr Ser Pro Thr Val Gly Leu Pro Gln Ala
 65 70 75 80

 Arg Arg Ala Ile Ala Glu Tyr Leu Ser Arg Asp Leu Pro Tyr Lys Leu
 85 90 95

 Ser Gln Asp Asp Val Phe Ile Thr Ser Gly Cys Thr Gln Ala Ile Asp
 100 105 110

 Val Ala Leu Ser Met Leu Ala Arg Pro Arg Ala Asn Ile Leu Leu Pro
 115 120 125

 Arg Pro Gly Phe Pro Ile Tyr Glu Leu Cys Ala Lys Phe Arg His Leu
 130 135 140

 Glu Val Arg Tyr Val Asp Leu Leu Pro Glu Asn Gly Trp Glu Ile Asp
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Glu Ala Leu Ala Asp Glu Asn Thr Val Ala Leu Val
 165 170 175

Val Ile Asn Pro Gly Asn Pro Cys Gly Asn Val Tyr Ser Tyr Gln His
 180 185 190

Leu Met Lys Ile Ala Glu Ser Ala Lys Lys Leu Gly Phe Leu Val Ile
 195 200 205

Ala Asp Glu Val Tyr Gly His Leu Ala Phe Gly Ser Lys Pro Phe Val
 210 215 220

Pro Met Gly Val Phe Gly Ser Ile Val Pro Val Leu Thr Leu Gly Ser
 225 230 235 240

Leu Ser Lys Arg Trp Ile Val Pro Gly Trp Arg Leu Gly Trp Phe Val
 245 250 255

Thr Thr Asp Pro Ser Gly Ser Phe Lys Asp Pro Lys Ile Ile Glu Arg
 260 265 270

Phe Lys Lys Tyr Phe Asp Ile Leu Gly Gly Pro Ala Thr Phe Ile Gln
 275 280 285

Ala Ala Val Pro Thr Ile Leu Glu Gln Thr Asp Glu Ser Phe Phe Lys
 290 295 300

Lys Thr Leu Asn Ser Leu Lys Asn Ser Ser Asp Ile Cys Cys Asp Trp
 305 310 315 320

Ile Lys Glu Ile Pro Cys Ile Asp Ser Ser His Arg Pro Glu Gly Ser
 325 330 335

Met Ala Met Met Val Lys Leu Asn Leu Ser Leu Leu Glu Asp Val Ser
 340 345 350

Asp Asp Ile Asp Phe Cys Phe Lys Leu Ala Arg Glu Glu Ser Val Ile
 355 360 365

Leu Leu Pro Gly Thr Ala Val Gly Leu Lys Asn Trp Leu Arg Ile Thr
 370 375 380

Phe Ala Ala Asp Ala Thr Ser Ile Glu Glu Ala Phe Lys Arg Ile Lys
 385 390 395 400

Cys Phe Tyr Leu Arg His Ala Lys Thr Gln Tyr Pro Thr Ile
 405 410

<210> 13
 <211> 1338
 <212> DNA
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1338)

<400> 13
 atg ggc cac caa aac gcc gcc gtt tca gag aat caa aac cat gat gac 48
 Met Gly His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp
 1 5 10 15

ggc gct gcg tcg tcg ccg gga ttc aag ctc gtc gga ttt tcc aag ttc 96
 Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe
 20 25 30

gta aga aag aat cca aag tct gat aaa ttc aag gtt aag cgc ttc cat 144
 Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His
 35 40 45

cac atc gag ttc tgg tgc ggc gac gca acc aac gtc gct cgt cgc ttc 192
 His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe
 50 55 60

tcc tgg ggt ctg ggg atg aga ttc tcc gcc aaa tcc gat ctt tcc acc 240
 Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr
 65 70 75 80

gga aac atg gtt cac gcc tct tac cta ctc acc tcc ggt gac ctc cga 288
 Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp Leu Arg
 85 90 95

ttc ctt ttc act gct cct tac tct ccg tct ctc tcc gcc gga gag att 336
 Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile
 100 105 110

aaa ccg aca acc aca gct tct atc cca agt ttc gat cac ggc tct tgt 384
 Lys Pro Thr Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys
 115 120 125

cgt tcc ttc ttc tct tca cat ggt ctc ggt gtt aga gcc gtt gcg att 432
 Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile
 130 135 140

gaa gta gaa gac gca gag tca gct ttc tcc atc agt gta gct aat ggc 480
 Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly
 145 150 155 160

gct att cct tcg tcg cct cct atc gtc ctc aat gaa gca gtt acg atc	528
Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile	
165 170 175	
gct gag gtt aaa cta tac ggc gat gtt gtt ctc cga tat gtt agt tac	576
Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr	
180 185 190	
aaa gca gaa gat acc gaa aaa tcc gaa ttc ttg cca ggg ttc gag cgt	624
Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg	
195 200 205	
gta gag gat gcg tcg tcg ttc cca ttg gat tat ggt atc cgg cgg ctt	672
Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu	
210 215 220	
gac cac gcc gtg gga aac gtt cct gag ctt ggt ccg gct tta act tat	720
Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr	
225 230 235 240	
gta gcg ggg ttc act ggt ttt cac caa ttc gca gag ttc aca gca gac	768
Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp	
245 250 255	
gac gtt gga acc gcc gag agc ggt tta aat tca gcg gtc ctg gct agc	816
Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser	
260 265 270	
aat gat gaa atg gtt ctt cta ccg att aac gag cca gtg cac gga aca	864
Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr	
275 280 285	
aag agg aag agt cag att cag acg tat ttg gaa cat aac gaa ggc gca	912
Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala	
290 295 300	
ggg cta caa cat ctg gct ctg atg agt gaa gac ata ttc agg acc ctg	960
Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu	
305 310 315 320	
aga gag atg agg aag agg agc agt att gga gga ttc gac ttc atg cct	1008
Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe Met Pro	
325 330 335	
tct cct ccg cct act tac tac cag aat ctc aag aaa cgg gtc ggc gac	1056
Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val Gly Asp	
340 345 350	
gtg ctc agc gat gat cag atc aag gag tgt gag gaa tta ggg att ctt	1104
Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu	

355	360	365	
gta gac aga gat gat caa ggg acg ttg ctt caa atc ttc aca aaa cca			1152
Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro			
370	375	380	
cta ggt gac agg ccg acg ata ttt ata gag ata atc cag aga gta gga			1200
Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly			
385	390	395	400
tgc atg atg aaa gat gag gaa ggg aag gct tac cag agt gga gga tgt			1248
Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys			
405	410	415	
ggt ggt ttt ggc aaa ggc aat ttc tct gag ctc ttc aag tcc att gaa			1296
Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu			
420	425	430	
gaa tac gaa aag act ctt gaa gcc aaa cag tta gtg gga tga			1338
Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly			
435	440	445	

<210> 14

<211> 445.

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 14

Met Gly His Gln Asn Ala Ala Val Ser Glu Asn Gln Asn His Asp Asp
1 5 10 15

Gly Ala Ala Ser Ser Pro Gly Phe Lys Leu Val Gly Phe Ser Lys Phe
20 25 30

Val Arg Lys Asn Pro Lys Ser Asp Lys Phe Lys Val Lys Arg Phe His
35 40 45

His Ile Glu Phe Trp Cys Gly Asp Ala Thr Asn Val Ala Arg Arg Phe
50 55 60

Ser Trp Gly Leu Gly Met Arg Phe Ser Ala Lys Ser Asp Leu Ser Thr
65 70 75 80

Gly Asn Met Val His Ala Ser Tyr Leu Leu Thr Ser Gly Asp Leu Arg
85 90 95

Phe Leu Phe Thr Ala Pro Tyr Ser Pro Ser Leu Ser Ala Gly Glu Ile
100 105 110

Lys Pro Thr Thr Ala Ser Ile Pro Ser Phe Asp His Gly Ser Cys
 115 120 125

Arg Ser Phe Phe Ser Ser His Gly Leu Gly Val Arg Ala Val Ala Ile
 130 135 140

Glu Val Glu Asp Ala Glu Ser Ala Phe Ser Ile Ser Val Ala Asn Gly
 145 150 155 160

Ala Ile Pro Ser Ser Pro Pro Ile Val Leu Asn Glu Ala Val Thr Ile
 165 170 175

Ala Glu Val Lys Leu Tyr Gly Asp Val Val Leu Arg Tyr Val Ser Tyr
 180 185 190

Lys Ala Glu Asp Thr Glu Lys Ser Glu Phe Leu Pro Gly Phe Glu Arg
 195 200 205

Val Glu Asp Ala Ser Ser Phe Pro Leu Asp Tyr Gly Ile Arg Arg Leu
 210 215 220

Asp His Ala Val Gly Asn Val Pro Glu Leu Gly Pro Ala Leu Thr Tyr
 225 230 235 240

Val Ala Gly Phe Thr Gly Phe His Gln Phe Ala Glu Phe Thr Ala Asp
 245 250 255

Asp Val Gly Thr Ala Glu Ser Gly Leu Asn Ser Ala Val Leu Ala Ser
 260 265 270

Asn Asp Glu Met Val Leu Leu Pro Ile Asn Glu Pro Val His Gly Thr
 275 280 285

Lys Arg Lys Ser Gln Ile Gln Thr Tyr Leu Glu His Asn Glu Gly Ala
 290 295 300

Gly Leu Gln His Leu Ala Leu Met Ser Glu Asp Ile Phe Arg Thr Leu
 305 310 315 320

Arg Glu Met Arg Lys Arg Ser Ser Ile Gly Gly Phe Asp Phe Met Pro
 325 330 335

Ser Pro Pro Pro Thr Tyr Tyr Gln Asn Leu Lys Lys Arg Val Gly Asp
 340 345 350

Val Leu Ser Asp Asp Gln Ile Lys Glu Cys Glu Glu Leu Gly Ile Leu
 355 360 365

Val Asp Arg Asp Asp Gln Gly Thr Leu Leu Gln Ile Phe Thr Lys Pro
 370 375 380

Leu Gly Asp Arg Pro Thr Ile Phe Ile Glu Ile Ile Gln Arg Val Gly
 385 390 395 400

Cys Met Met Lys Asp Glu Glu Gly Lys Ala Tyr Gln Ser Gly Gly Cys
 405 410 415

Gly Gly Phe Gly Lys Gly Asn Phe Ser Glu Leu Phe Lys Ser Ile Glu
 420 425 430

Glu Tyr Glu Lys Thr Leu Glu Ala Lys Gln Leu Val Gly
 435 440 445

<210> 15

<211> 1182

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1182)

<400> 15

atg gag tct ctg ctc tct agt tct tct ctt gtt tcc gct gct ggt ggg 48
 Met Glu Ser Leu Leu Ser Ser Ser Ser Leu Val Ser Ala Ala Gly Gly
 1 5 10 15

ttt tgt tgg aag aag cag aat cta aag ctc cac tct tta tca gaa atc 96
 Phe Cys Trp Lys Lys Gln Asn Leu Lys Leu His Ser Leu Ser Glu Ile
 20 25 30

cga gtt ctg cgt tgt gat tcg agt aaa gtt gtc gca aaa ccg aag ttt 144
 Arg Val Leu Arg Cys Asp Ser Ser Lys Val Val Ala Lys Pro Lys Phe
 35 40 45

agg aac aat ctt gtt agg cct gat ggt caa gga tct tca ttg ttg ttg 192
 Arg Asn Asn Leu Val Arg Pro Asp Gly Gln Gly Ser Ser Leu Leu Leu
 50 55 60

tat cca aaa cat aag tcg aga ttt cgg gtt aat gcc act gcg ggt cag 240
 Tyr Pro Lys His Lys Ser Arg Phe Arg Val Asn Ala Thr Ala Gly Gln
 65 70 75 80

ccc gag gct ttc gac tcg aat agc aaa cag aag tct ttt aga gac tcg 288
 Pro Glu Ala Phe Asp Ser Asn Ser Lys Gln Lys Ser Phe Arg Asp Ser
 85 90 95

tta gat gcg ttt tac agg ttt tct agg cct cat aca gtt att ggc aca 336
 Leu Asp Ala Phe Tyr Arg Phe Ser Arg Pro His Thr Val Ile Gly Thr

100	105	110	
gtg ctt agc att tta tct gta tct ttc tta gca gta gag aag gtt tct			384
Val Leu Ser Ile Leu Ser Val Ser Phe Leu Ala Val Glu Lys Val Ser			
115	120	125	
gat ata tct cct tta ctt ttc act ggc atc ttg gag gct gtt gtt gca			432
Asp Ile Ser Pro Leu Leu Phe Thr Gly Ile Leu Glu Ala Val Val Ala			
130	135	140	
gct ctc atg atg aac att tac ata gtt ggg cta aat cag ttg tct gat			480
Ala Leu Met Met Asn Ile Tyr Ile Val Gly Leu Asn Gln Leu Ser Asp			
145	150	155	160
gtt gaa ata gat aag gtt aac aag ccc tat ctt cca ttg gca tca gga			528
Val Glu Ile Asp Lys Val Asn Lys Pro Tyr Leu Pro Leu Ala Ser Gly			
165	170	175	
gaa tat tct gtt aac acc ggc att gca ata gta gct tcc ttc tcc atc			576
Glu Tyr Ser Val Asn Thr Gly Ile Ala Ile Val Ala Ser Phe Ser Ile			
180	185	190	
atg agt ttc tgg ctt ggg tgg att gtt ggt tca tgg cca ttg ttc tgg			624
Met Ser Phe Trp Leu Gly Trp Ile Val Gly Ser Trp Pro Leu Phe Trp			
195	200	205	
gct ctt ttt gtg agt ttc atg ctc ggt act gca tac tct atc aat ttg			672
Ala Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Ile Asn Leu			
210	215	220	
cca ctt tta cgg tgg aaa aga ttt gca ttg gtt gca gca atg tgt atc			720
Pro Leu Leu Arg Trp Lys Arg Phe Ala Leu Val Ala Ala Met Cys Ile			
225	230	235	240
ctc gct gtc cga gct att att gtt caa atc gcc ttt tat cta cat att			768
Leu Ala Val Arg Ala Ile Ile Val Gln Ile Ala Phe Tyr Leu His Ile			
245	250	255	
cag aca cat gtg ttt gga aga cca atc ttg ttc act agg cct ctt att			816
Gln Thr His Val Phe Gly Arg Pro Ile Leu Phe Thr Arg Pro Leu Ile			
260	265	270	
ttc gcc act gcg ttt atg agc ttt ttc tct gtc gtt att gca ttg ttt			864
Phe Ala Thr Ala Phe Met Ser Phe Phe Ser Val Val Ile Ala Leu Phe			
275	280	285	
aag gat ata cct gat atc gaa ggg gat aag ata ttc gga atc cga tca			912
Lys Asp Ile Pro Asp Ile Glu Gly Asp Lys Ile Phe Gly Ile Arg Ser			
290	295	300	

ttc tct gta act ctg ggt cag aaa cgg gtg ttt tgg aca tgt gtt aca 960
 Phe Ser Val Thr Leu Gly Gln Lys Arg Val Phe Trp Thr Cys Val Thr
 305 310 315 320

 cta ctt caa atg gct tac gct gtt gca att cta gtt gga gcc aca tct 1008
 Leu Leu Gln Met Ala Tyr Ala Val Ala Ile Leu Val Gly Ala Thr Ser
 325 330 335

 cca ttc ata tgg agc aaa gtc atc tcg gtt gtg ggt cat gtt ata ctc 1056
 Pro Phe Ile Trp Ser Lys Val Ile Ser Val Val Gly His Val Ile Leu
 340 345 350

 gca aca act ttg tgg gct cga gct aag tcc gtt gat ctg agt agc aaa 1104
 Ala Thr Thr Leu Trp Ala Arg Ala Lys Ser Val Asp Leu Ser Ser Lys
 355 360 365

 acc gaa ata act tca tgt tat atg ttc ata tgg aag ctc ttt tat gca 1152
 Thr Glu Ile Thr Ser Cys Tyr Met Phe Ile Trp Lys Leu Phe Tyr Ala
 370 375 380

 gag tac ttg ctg tta cct ttt ttg aag tga 1182
 Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Phe Leu Lys
 385 390

<210> 16

<211> 393

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 16

Met Glu Ser Leu Leu Ser Ser Ser Ser Leu Val Ser Ala Ala Gly Gly
 1 5 10 15

 Phe Cys Trp Lys Lys Gln Asn Leu Lys Leu His Ser Leu Ser Glu Ile
 20 25 30

 Arg Val Leu Arg Cys Asp Ser Ser Lys Val Val Ala Lys Pro Lys Phe
 35 40 45

 Arg Asn Asn Leu Val Arg Pro Asp Gly Gln Gly Ser Ser Leu Leu Leu
 50 55 60

 Tyr Pro Lys His Lys Ser Arg Phe Arg Val Asn Ala Thr Ala Gly Gln
 65 70 75 80

 Pro Glu Ala Phe Asp Ser Asn Ser Lys Gln Lys Ser Phe Arg Asp Ser
 85 90 95

 Leu Asp Ala Phe Tyr Arg Phe Ser Arg Pro His Thr Val Ile Gly Thr

100	105	110
Val Leu Ser Ile Leu Ser Val Ser Phe Leu Ala Val Glu Lys Val Ser		
115	120	125
Asp Ile Ser Pro Leu Leu Phe Thr Gly Ile Leu Glu Ala Val Val Ala		
130	135	140
Ala Leu Met Met Asn Ile Tyr Ile Val Gly Leu Asn Gln Leu Ser Asp		
145	150	155
Val Glu Ile Asp Lys Val Asn Lys Pro Tyr Leu Pro Leu Ala Ser Gly		
	165	170
Glu Tyr Ser Val Asn Thr Gly Ile Ala Ile Val Ala Ser Phe Ser Ile		
	180	185
Met Ser Phe Trp Leu Gly Trp Ile Val Gly Ser Trp Pro Leu Phe Trp		
	195	200
Ala Leu Phe Val Ser Phe Met Leu Gly Thr Ala Tyr Ser Ile Asn Leu		
	210	215
Pro Leu Leu Arg Trp Lys Arg Phe Ala Leu Val Ala Ala Met Cys Ile		
	225	230
Leu Ala Val Arg Ala Ile Ile Val Gln Ile Ala Phe Tyr Leu His Ile		
	245	250
Gln Thr His Val Phe Gly Arg Pro Ile Leu Phe Thr Arg Pro Leu Ile		
	260	265
Phe Ala Thr Ala Phe Met Ser Phe Phe Ser Val Val Ile Ala Leu Phe		
	275	280
Lys Asp Ile Pro Asp Ile Glu Gly Asp Lys Ile Phe Gly Ile Arg Ser		
	290	295
Phe Ser Val Thr Leu Gly Gln Lys Arg Val Phe Trp Thr Cys Val Thr		
	305	310
Leu Leu Gln Met Ala Tyr Ala Val Ala Ile Leu Val Gly Ala Thr Ser		
	325	330
Pro Phe Ile Trp Ser Lys Val Ile Ser Val Val Gly His Val Ile Leu		
	340	345
Ala Thr Thr Leu Trp Ala Arg Ala Lys Ser Val Asp Leu Ser Ser Lys		
	355	360
		365

Thr Glu Ile Thr Ser Cys Tyr Met Phe Ile Trp Lys Leu Phe Tyr Ala
 370 375 380

Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Phe Leu Lys
 385 390

<210> 17

<211> 1509

<212> DNA

<213> Nicotiana tabacum

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1395)

<400> 17

atg gct tcc att gct ctc aaa act ttc acc ggc ctc cgt caa tcc tcg 48
 Met Ala Ser Ile Ala Leu Lys Thr Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser Ser

1

5

10

15

ccg gaa aac aat tcc att act ctt tct aaa tcc ctc ccc ttc acc caa 96
 Pro Glu Asn Asn Ser Ile Thr Leu Ser Lys Ser Leu Pro Phe Thr Gln

20

25

30

acc cac cgt agg ctc cga atc aat gct tcc aaa tcc agc cca aga gtc 144
 Thr His Arg Arg Leu Arg Ile Asn Ala Ser Lys Ser Ser Pro Arg Val

35

40

45

aac ggc cgc aat ctt cgt gtt gcg gtg gtg ggc ggt ggt cct gct ggt 192
 Asn Gly Arg Asn Leu Arg Val Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly

50

55

60

ggc gcc gcc gct gaa aca ctc gcc aag gga gga att gaa acc ttc tta 240
 Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Lys Gly Gly Ile Glu Thr Phe Leu

65

70

75

80

atc gaa cgc aaa atg gac aac tgc aaa ccc tgc ggt ggg gcc atc cca 288
 Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly Ala Ile Pro

85

90

95

ctt tgc atg gtg gga gaa ttt gac ctc cct ttg gat atc att gac cgg 336
 Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Ile Ile Asp Arg

100

105

110

aaa gtt aca aag atg aag atg att tcc cca tcc aac gtt gct gtt gat 384
 Lys Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Val Ala Val Asp

115

120

125

att ggt cag act tta aag cct cac gag tac atc ggt atg gtg cgc cgc 432

Ile	Gly	Gln	Thr	Leu	Lys	Pro	His	Glu	Tyr	Ile	Gly	Met	Val	Arg	Arg	
130						135					140					
gaa gta ctc gat gct tac ctc cgt gac cgc gct gct gaa gcc gga gcc 480																
Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Asp Arg Ala Ala Glu Ala Gly Ala																
145					150					155						160
tct gtt ctc aac ggc ttg ttc ctc aaa atg gac atg ccc aaa gct ccc 528																
Ser Val Leu Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp Met Pro Lys Ala Pro																
				165					170						175	
aac gca cct tac gtc ctt cac tac aca gct tac gac tcc aaa act aat 576																
Asn Ala Pro Tyr Val Leu His Tyr Thr Ala Tyr Asp Ser Lys Thr Asn																
				180					185						190	
ggc gcg ggg gag aag cgt acc ctg gaa gtt gac gcc gtt atc ggc gct 624																
Gly Ala Gly Glu Lys Arg Thr Leu Glu Val Asp Ala Val Ile Gly Ala																
				195				200							205	
gac ggt gca aat tcc cgt gtc gca aaa tcc ata aac gcc ggt gac tac 672																
Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asn Ala Gly Asp Tyr																
				210				215							220	
gag tac gct att gca ttc caa gaa agg att aaa att tcc gat gat aaa 720																
Glu Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Lys Ile Ser Asp Asp Lys																
225					230					235						240
atg aag tat tac gag aat tta gct gaa atg tac gtg ggt gat gac gtg 768																
Met Lys Tyr Tyr Glu Asn Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly Asp Asp Val																
				245						250						255
tcc cct gat ttt tac ggg tgg gtt ttc ccc aaa tgt gac cac gtt gcc 816																
Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp His Val Ala																
				260						265						270
gtt ggc act ggc aca gtc acc cac aaa gct gac atc aaa aaa ttc cag 864																
Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Ala Asp Ile Lys Lys Phe Gln																
				275				280								285
cta gct aca aga ttg aga gct gat tcc aaa atc acc ggc gga aaa att 912																
Leu Ala Thr Arg Leu Arg Ala Asp Ser Lys Ile Thr Gly Gly Lys Ile																
				290				295								300
atc cgg gtc gag gcc cac ccg att cca gaa cac cca aga ccc aga aga 960																
Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg Pro Arg Arg																
305					310					315						320
tta caa gac aga gtt gca ttg gtt ggt gat gcg gca ggg tac gtg acc 1008																
Leu Gln Asp Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly Tyr Val Thr																
				325						330						335

aaa tgt tcg ggc gaa ggg att tac ttc gcg gca aag agt gga cgt atg 1056
 Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser Gly Arg Met
 340 345 350

tgt gct gaa gca att gtt gaa ggg tca gaa atg gga aaa aga atg gtg 1104
 Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Glu Met Gly Lys Arg Met Val
 355 360 365

gac gag agt gat ttg agg aag tat ttg gag aaa tgg gac aag act tat 1152
 Asp Glu Ser Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp Lys Thr Tyr
 370 375 380

tgg cca acg tac aag gtg ctt gat ata ttg cag aag gta ttt tac agg 1200
 Trp Pro Thr Tyr Lys Val Leu Asp Ile Leu Gln Lys Val Phe Tyr Arg
 385 390 395 400

tcg aat ccg gcg agg gaa gca ttt gtt gaa atg tgc gca gat gag tat 1248
 Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Ala Asp Glu Tyr
 405 410 415

gtg cag aag atg aca ttt gac agc tat ttg tac aag aaa gta gca cca 1296
 Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Lys Val Ala Pro
 420 425 430

gga aac cca att gaa gac ttg aag ctt gct gtg aat acc att gga agt 1344
 Gly Asn Pro Ile Glu Asp Leu Lys Leu Ala Val Asn Thr Ile Gly Ser
 435 440 445

ttg gtg aga gct aat gca cta aga agg gaa atg gac aag ctc agt gta 1392
 Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Met Asp Lys Leu Ser Val
 450 455 460

taa gaagattaac agcattaata ttttcttgta attgaaggat ttatttctca 1445
 465

aattactctg taaacacctt tcacctgcc tttaatcgga tttatgtaac ttcataattt 1505
 gagc 1509

<210> 18

<211> 464

<212> PRT

<213> Nicotiana tabacum

<400> 18

Met Ala Ser Ile Ala Leu Lys Thr Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser Ser

1

5

10

15

Pro Glu Asn Asn Ser Ile Thr Leu Ser Lys Ser Leu Pro Phe Thr Gln
 20 25 30
 Thr His Arg Arg Leu Arg Ile Asn Ala Ser Lys Ser Ser Pro Arg Val
 35 40 45
 Asn Gly Arg Asn Leu Arg Val Ala Val Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly
 50 55 60
 Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Lys Gly Gly Ile Glu Thr Phe Leu
 65 70 75 80
 Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly Ala Ile Pro
 85 90 95
 Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Ile Ile Asp Arg
 100 105 110
 Lys Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Val Ala Val Asp
 115 120 125
 Ile Gly Gln Thr Leu Lys Pro His Glu Tyr Ile Gly Met Val Arg Arg
 130 135 140
 Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Asp Arg Ala Ala Glu Ala Gly Ala
 145 150 155 160
 Ser Val Leu Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp Met Pro Lys Ala Pro
 165 170 175
 Asn Ala Pro Tyr Val Leu His Tyr Thr Ala Tyr Asp Ser Lys Thr Asn
 180 185 190
 Gly Ala Gly Glu Lys Arg Thr Leu Glu Val Asp Ala Val Ile Gly Ala
 195 200 205
 Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asn Ala Gly Asp Tyr
 210 215 220
 Glu Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Lys Ile Ser Asp Asp Lys
 225 230 235 240
 Met Lys Tyr Tyr Glu Asn Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly Asp Asp Val
 245 250 255
 Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp His Val Ala
 260 265 270
 Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Ala Asp Ile Lys Lys Phe Gln

275	280	285
Leu Ala Thr Arg Leu Arg Ala Asp Ser Lys Ile Thr Gly Gly Lys Ile		
290	295	300
Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg Pro Arg Arg		
305	310	315 320
Leu Gln Asp Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly Tyr Val Thr		
	325	330 335
Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser Gly Arg Met		
	340	345 350
Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Glu Met Gly Lys Arg Met Val		
	355	360 365
Asp Glu Ser Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp Lys Thr Tyr		
	370	375 380
Trp Pro Thr Tyr Lys Val Leu Asp Ile Leu Gln Lys Val Phe Tyr Arg		
	385	390 395 400
Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Ala Asp Glu Tyr		
	405	410 415
Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Lys Val Ala Pro		
	420	425 430
Gly Asn Pro Ile Glu Asp Leu Lys Leu Ala Val Asn Thr Ile Gly Ser		
	435	440 445
Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Met Asp Lys Leu Ser Val		
	450	455 460

<210> 19

<211> 957

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(957)

<400> 19

atg ccc gag tat ttg ctt ctg ccc gct ggc cta att tcc ctc tcc ctg	48
Met Pro Glu Tyr Leu Leu Leu Pro Ala Gly Leu Ile Ser Leu Ser Leu	

1

5

10

15

gcg atc gcc gct gga ctg tat ctc cta act gcc cgg ggc tat cag tca	96
Ala Ile Ala Ala Gly Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Arg Gly Tyr Gln Ser	
20 25 30	
tcg gat tcc gtg gcc aac gcc tac gac caa tgg aca gag gac ggc att	144
Ser Asp Ser Val Ala Asn Ala Tyr Asp Gln Trp Thr Glu Asp Gly Ile	
35 40 45	
ttg gaa tat tac tgg ggc gac cat atc cac ctc ggc cat tat ggc gat	192
Leu Glu Tyr Tyr Trp Gly Asp His Ile His Leu Gly His Tyr Gly Asp	
50 55 60	
ccg cca gtg gcc aag gat ttc atc caa tcg aaa att gat ttt gtc cat	240
Pro Pro Val Ala Lys Asp Phe Ile Gln Ser Lys Ile Asp Phe Val His	
65 70 75 80	
gcc atg gcc cag tgg ggc gga tta gat aca ctt ccc ccc ggc aca acg	288
Ala Met Ala Gln Trp Gly Gly Leu Asp Thr Leu Pro Pro Gly Thr Thr	
85 90 95	
gta ttg gat gtg ggt tgc ggc att ggc ggt agc agt cgc att ctc gcc	336
Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Ile Leu Ala	
100 105 110	
aaa gat tat ggt ttt aac gtt acc ggc atc acc att agt ccc caa cag	384
Lys Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro Gln Gln	
115 120 125	
gtg aaa cgg gcg acg gaa tta act cct ccc gat gtg acg gcc aag ttt	432
Val Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala Lys Phe	
130 135 140	
gcg gtg gac gat gct atg gct ttg tct ttt cct gac ggt agt ttc gac	480
Ala Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser Phe Asp	
145 150 155 160	
gta gtt tgg tcg gtg gaa gca ggg ccc cac atg cct gac aaa gct gtg	528
Val Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys Ala Val	
165 170 175	
ttt gcc aag gaa tta ctg cgg gtc gtg aaa cca ggg ggc att ctg gtg	576
Phe Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile Leu Val	
180 185 190	
gtg gcg gat tgg aat caa cgg gac gat cgc caa gtg ccc ctc aac ttc	624
Val Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu Asn Phe	
195 200 205	
tgg gaa aaa cca gtg atg cga caa ctg ttg gat caa tgg tcc cac cct	672
Trp Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser His Pro	

210	215	220	
gcc ttt gcc agc att gaa ggt ttt gcg gaa aat ttg gaa gcc acg ggt			720
Ala Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala Thr Gly			
225	230	235	240
ttg gtg gag ggc cag gtg act act gct gat tgg act gta ccg acc ctc			768
Leu Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro Thr Leu			
245	250		255
ccc gct tgg ttg gat acc att tgg cag ggc att atc cgg ccc cag ggc			816
Pro Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro Gln Gly			
260	265		270
tgg tta caa tac ggc att cgt ggg ttt atc aaa tcc gtg cgg gaa gta			864
Trp Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg Glu Val			
275	280		285
ccg act att tta ttg atg cgc ctt gcc ttt ggg gta gga ctt tgt cgc			912
Pro Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu Cys Arg			
290	295		300
ttc ggt atg ttc aaa gca gtg cga aaa aac gcc act caa gct taa			957
Phe Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala			
305	310		315

<210> 20

<211> 318

<212> PRT

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 20

Met	Pro	Glu	Tyr	Leu	Leu	Leu	Pro	Ala	Gly	Leu	Ile	Ser	Leu	Ser	Leu
1				5					10				15		

Ala	Ile	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Leu	Leu	Thr	Ala	Arg	Gly	Tyr	Gln	Ser
			20					25					30		

Ser	Asp	Ser	Val	Ala	Asn	Ala	Tyr	Asp	Gln	Trp	Thr	Glu	Asp	Gly	Ile
	35						40					45			

Leu	Glu	Tyr	Tyr	Trp	Gly	Asp	His	Ile	His	Leu	Gly	His	Tyr	Gly	Asp
	50					55					60				

Pro	Pro	Val	Ala	Lys	Asp	Phe	Ile	Gln	Ser	Lys	Ile	Asp	Phe	Val	His
	65				70					75				80	

Ala	Met	Ala	Gln	Trp	Gly	Gly	Leu	Asp	Thr	Leu	Pro	Pro	Gly	Thr	Thr
			85					90						95	

Val Leu Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Ile Leu Ala
 100 105 110
 Lys Asp Tyr Gly Phe Asn Val Thr Gly Ile Thr Ile Ser Pro Gln Gln
 115 120 125
 Val Lys Arg Ala Thr Glu Leu Thr Pro Pro Asp Val Thr Ala Lys Phe
 130 135 140
 Ala Val Asp Asp Ala Met Ala Leu Ser Phe Pro Asp Gly Ser Phe Asp
 145 150 155 160
 Val Val Trp Ser Val Glu Ala Gly Pro His Met Pro Asp Lys Ala Val
 165 170 175
 Phe Ala Lys Glu Leu Leu Arg Val Val Lys Pro Gly Gly Ile Leu Val
 180 185 190
 Val Ala Asp Trp Asn Gln Arg Asp Asp Arg Gln Val Pro Leu Asn Phe
 195 200 205
 Trp Glu Lys Pro Val Met Arg Gln Leu Leu Asp Gln Trp Ser His Pro
 210 215 220
 Ala Phe Ala Ser Ile Glu Gly Phe Ala Glu Asn Leu Glu Ala Thr Gly
 225 230 235 240
 Leu Val Glu Gly Gln Val Thr Thr Ala Asp Trp Thr Val Pro Thr Leu
 245 250 255
 Pro Ala Trp Leu Asp Thr Ile Trp Gln Gly Ile Ile Arg Pro Gln Gly
 260 265 270
 Trp Leu Gln Tyr Gly Ile Arg Gly Phe Ile Lys Ser Val Arg Glu Val
 275 280 285
 Pro Thr Ile Leu Leu Met Arg Leu Ala Phe Gly Val Gly Leu Cys Arg
 290 295 300
 Phe Gly Met Phe Lys Ala Val Arg Lys Asn Ala Thr Gln Ala
 305 310 315

<210> 21

<211> 1100

<212> DNA

<213> Synechocystis PCC6803

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1092)

<400> 21

```

atg aaa ttt ccg ccc cac agt ggt tac cat tgg caa ggt caa tca cct 48
Met Lys Phe Pro Pro His Ser Gly Tyr His Trp Gln Gly Gln Ser Pro
  1              5              10              15

ttc ttt gaa ggt tgg tac gtg cgc ctg ctt ttg ccc caa tcc ggg gaa 96
Phe Phe Glu Gly Trp Tyr Val Arg Leu Leu Leu Pro Gln Ser Gly Glu
      20              25              30

agt ttt gct ttt atg tac tcc atc gaa aat cct gct agc gat cat cat 144
Ser Phe Ala Phe Met Tyr Ser Ile Glu Asn Pro Ala Ser Asp His His
      35              40              45

tac ggc ggc ggt gct gtg caa att tta ggg ccg gct acg aaa aaa caa 192
Tyr Gly Gly Gly Ala Val Gln Ile Leu Gly Pro Ala Thr Lys Lys Gln
      50              55              60

gaa aat cag gaa gac caa ctt gtt tgg cgg aca ttt ccc tcg gta aaa 240
Glu Asn Gln Glu Asp Gln Leu Val Trp Arg Thr Phe Pro Ser Val Lys
      65              70              75              80

aaa ttt tgg gcc agt cct cgc cag ttt gcc cta ggg cat tgg gga aaa 288
Lys Phe Trp Ala Ser Pro Arg Gln Phe Ala Leu Gly His Trp Gly Lys
      85              90              95

tgt agg gat aac agg cag gcg aaa ccc cta ctc tcc gaa gaa ttt ttt 336
Cys Arg Asp Asn Arg Gln Ala Lys Pro Leu Leu Ser Glu Glu Phe Phe
      100              105              110

gcc acg gtc aag gaa ggt tat caa atc cat caa aat cag cac caa gga 384
Ala Thr Val Lys Glu Gly Tyr Gln Ile His Gln Asn Gln His Gln Gly
      115              120              125

caa atc att cat ggc gat cgc cat tgt cgt tgg cag ttc acc gta gaa 432
Gln Ile Ile His Gly Asp Arg His Cys Arg Trp Gln Phe Thr Val Glu
      130              135              140

ccg gaa gta act tgg ggg agt cct aac cga ttt cct cgg gct aca gcg 480
Pro Glu Val Thr Trp Gly Ser Pro Asn Arg Phe Pro Arg Ala Thr Ala
      145              150              155              160

ggg tgg ctt tcc ttt tta ccc ttg ttt gat ccc ggt tgg caa att ctt 528
Gly Trp Leu Ser Phe Leu Pro Leu Phe Asp Pro Gly Trp Gln Ile Leu
      165              170              175

tta gcc caa ggt aga gcg cac ggc tgg ctg aaa tgg cag agg gaa cag 576
Leu Ala Gln Gly Arg Ala His Gly Trp Leu Lys Trp Gln Arg Glu Gln

```

180	185	190	
tat gaa ttt gac cac gcc cta gtt tat gcc gaa aaa aat tgg ggt cac			624
Tyr Glu Phe Asp His Ala Leu Val Tyr Ala Glu Lys Asn Trp Gly His			
195	200	205	
tcc ttt ccc tcc cgc tgg ttt tgg ctc caa gca aat tat ttt cct gac			672
Ser Phe Pro Ser Arg Trp Phe Trp Leu Gln Ala Asn Tyr Phe Pro Asp			
210	215	220	
cat cca gga ctg agc gtc act gcc gct ggc ggg gaa cgg att gtt ctt			720
His Pro Gly Leu Ser Val Thr Ala Ala Gly Gly Glu Arg Ile Val Leu			
225	230	235	240
ggt cgc ccc gaa gag gta gct tta att ggc tta cat cac caa ggt aat			768
Gly Arg Pro Glu Glu Val Ala Leu Ile Gly Leu His His Gln Gly Asn			
	245	250	255
ttt tac gaa ttt ggc ccg ggc cat ggc aca gtc act tgg caa gta gct			816
Phe Tyr Glu Phe Gly Pro Gly His Gly Thr Val Thr Trp Gln Val Ala			
	260	265	270
ccc tgg ggc cgt tgg caa tta aaa gcc agc aat gat agg tat tgg gtc			864
Pro Trp Gly Arg Trp Gln Leu Lys Ala Ser Asn Asp Arg Tyr Trp Val			
	275	280	285
aag ttg tcc gga aaa aca gat aaa aaa ggc agt tta gtc cac act ccc			912
Lys Leu Ser Gly Lys Thr Asp Lys Lys Gly Ser Leu Val His Thr Pro			
	290	295	300
acc gcc cag ggc tta caa ctc aac tgc cga gat acc act agg ggc tat			960
Thr Ala Gln Gly Leu Gln Leu Asn Cys Arg Asp Thr Thr Arg Gly Tyr			
	305	310	315
ttg tat ttg caa ttg gga tct gtg ggt cac ggc ctg ata gtg caa ggg			1008
Leu Tyr Leu Gln Leu Gly Ser Val Gly His Gly Leu Ile Val Gln Gly			
	325	330	335
gaa acg gac acc gcg ggg cta gaa gtt gga ggt gat tgg ggt tta aca			1056
Glu Thr Asp Thr Ala Gly Leu Glu Val Gly Gly Asp Trp Gly Leu Thr			
	340	345	350
gag gaa aat ttg agc aaa aaa aca gtg cca ttc tga gggaataa			1100
Glu Glu Asn Leu Ser Lys Lys Thr Val Pro Phe			
	355	360	

<210> 22

<211> 363

<212> PRT

<213> Synechocystis PCC6803

<400> 22

Met Lys Phe Pro Pro His Ser Gly Tyr His Trp Gln Gly Gln Ser Pro
 1 5 10 15
 Phe Phe Glu Gly Trp Tyr Val Arg Leu Leu Leu Pro Gln Ser Gly Glu
 20 25 30
 Ser Phe Ala Phe Met Tyr Ser Ile Glu Asn Pro Ala Ser Asp His His
 35 40 45
 Tyr Gly Gly Gly Ala Val Gln Ile Leu Gly Pro Ala Thr Lys Lys Gln
 50 55 60
 Glu Asn Gln Glu Asp Gln Leu Val Trp Arg Thr Phe Pro Ser Val Lys
 65 70 75 80
 Lys Phe Trp Ala Ser Pro Arg Gln Phe Ala Leu Gly His Trp Gly Lys
 85 90 95
 Cys Arg Asp Asn Arg Gln Ala Lys Pro Leu Leu Ser Glu Glu Phe Phe
 100 105 110
 Ala Thr Val Lys Glu Gly Tyr Gln Ile His Gln Asn Gln His Gln Gly
 115 120 125
 Gln Ile Ile His Gly Asp Arg His Cys Arg Trp Gln Phe Thr Val Glu
 130 135 140
 Pro Glu Val Thr Trp Gly Ser Pro Asn Arg Phe Pro Arg Ala Thr Ala
 145 150 155 160
 Gly Trp Leu Ser Phe Leu Pro Leu Phe Asp Pro Gly Trp Gln Ile Leu
 165 170 175
 Leu Ala Gln Gly Arg Ala His Gly Trp Leu Lys Trp Gln Arg Glu Gln
 180 185 190
 Tyr Glu Phe Asp His Ala Leu Val Tyr Ala Glu Lys Asn Trp Gly His
 195 200 205
 Ser Phe Pro Ser Arg Trp Phe Trp Leu Gln Ala Asn Tyr Phe Pro Asp
 210 215 220
 His Pro Gly Leu Ser Val Thr Ala Ala Gly Gly Glu Arg Ile Val Leu
 225 230 235 240
 Gly Arg Pro Glu Glu Val Ala Leu Ile Gly Leu His His Gln Gly Asn
 245 250 255

Phe Tyr Glu Phe Gly Pro Gly His Gly Thr Val Thr Trp Gln Val Ala
 260 265 270

Pro Trp Gly Arg Trp Gln Leu Lys Ala Ser Asn Asp Arg Tyr Trp Val
 275 280 285

Lys Leu Ser Gly Lys Thr Asp Lys Lys Gly Ser Leu Val His Thr Pro
 290 295 300

Thr Ala Gln Gly Leu Gln Leu Asn Cys Arg Asp Thr Thr Arg Gly Tyr
 305 310 315 320

Leu Tyr Leu Gln Leu Gly Ser Val Gly His Gly Leu Ile Val Gln Gly
 325 330 335

Glu Thr Asp Thr Ala Gly Leu Glu Val Gly Gly Asp Trp Gly Leu Thr
 340 345 350

Glu Glu Asn Leu Ser Lys Lys Thr Val Pro Phe
 355 360

<210> 23

<211> 1047

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1047)

<400> 23

atg aaa gca act cta gca gca ccc tct tct ctc aca agc ctc cct tat 48
 Met Lys Ala Thr Leu Ala Ala Pro Ser Ser Leu Thr Ser Leu Pro Tyr
 1 5 10 15

cga acc aac tct tct ttc ggc tca aag tca tcg ctt ctc ttt cgg tct 96
 Arg Thr Asn Ser Ser Phe Gly Ser Lys Ser Ser Leu Leu Phe Arg Ser
 20 25 30

cca tcc tcc tcc tcc tca gtc tct atg acg aca acg cgt gga aac gtg 144
 Pro Ser Ser Ser Ser Ser Val Ser Met Thr Thr Thr Arg Gly Asn Val
 35 40 45

gct gtg gcg gct gct gct aca tcc act gag gcg cta aga aaa gga ata 192
 Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Ser Thr Glu Ala Leu Arg Lys Gly Ile
 50 55 60

gcg gag ttc tac aat gaa act tcg ggt ttg tgg gaa gag att tgg gga 240

Ala	Glu	Phe	Tyr	Asn	Glu	Thr	Ser	Gly	Leu	Trp	Glu	Glu	Ile	Trp	Gly	
65					70				75						80	
gat	cat	atg	cat	cat	ggc	ttt	tgt	gac	cct	gat	tct	tct	gtt	caa	ctt	288
Asp	His	Met	His	His	Gly	Phe	Cys	Asp	Pro	Asp	Ser	Ser	Val	Gln	Leu	
				85				90						95		
tct	gat	tct	ggg	cac	aag	gaa	gct	cag	atc	cgt	atg	att	gaa	gag	tct	336
Ser	Asp	Ser	Gly	His	Lys	Glu	Ala	Gln	Ile	Arg	Met	Ile	Glu	Glu	Ser	
			100					105					110			
ctc	cgt	ttt	gcc	ggg	gtt	act	gat	gaa	gag	gag	gag	aaa	aag	ata	aag	384
Leu	Arg	Phe	Ala	Gly	Val	Thr	Asp	Glu	Glu	Glu	Glu	Lys	Lys	Ile	Lys	
		115					120					125				
aaa	gta	gtg	gat	gtt	ggg	tgt	ggg	att	gga	gga	agc	tca	aga	tat	ctt	432
Lys	Val	Val	Asp	Val	Gly	Cys	Gly	Ile	Gly	Gly	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	
	130					135					140					
gcc	tct	aaa	ttt	gga	gct	gaa	tgc	att	ggc	att	act	ctc	agc	cct	gtt	480
Ala	Ser	Lys	Phe	Gly	Ala	Glu	Cys	Ile	Gly	Ile	Thr	Leu	Ser	Pro	Val	
145					150					155					160	
cag	gcc	aag	aga	gcc	aat	gat	ctc	gcg	gct	gct	caa	tca	ctc	gct	cat	528
Gln	Ala	Lys	Arg	Ala	Asn	Asp	Leu	Ala	Ala	Ala	Gln	Ser	Leu	Ala	His	
				165				170						175		
aag	gct	tcc	ttc	caa	gtt	gcg	gat	gcg	ttg	gat	cag	cca	ttc	gaa	gat	576
Lys	Ala	Ser	Phe	Gln	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Asp	Gln	Pro	Phe	Glu	Asp	
			180					185					190			
gga	aaa	ttc	gat	ata	gtg	tgg	tcg	atg	gag	agt	ggt	gag	cat	atg	cct	624
Gly	Lys	Phe	Asp	Ile	Val	Trp	Ser	Met	Glu	Ser	Gly	Glu	His	Met	Pro	
		195					200					205				
gac	aag	gcc	aag	ttt	gta	aaa	gag	ttg	gta	cgt	gtg	gcg	gct	cca	gga	672
Asp	Lys	Ala	Lys	Phe	Val	Lys	Glu	Leu	Val	Arg	Val	Ala	Ala	Pro	Gly	
	210					215				220						
ggg	agg	ata	ata	ata	gtg	aca	tgg	tgc	cat	aga	aat	cta	tct	gcg	ggg	720
Gly	Arg	Ile	Ile	Ile	Val	Thr	Trp	Cys	His	Arg	Asn	Leu	Ser	Ala	Gly	
225					230					235					240	
gag	gaa	gct	ttg	cag	ccg	tgg	gag	caa	aac	atc	ttg	gac	aaa	atc	cgt	768
Glu	Glu	Ala	Leu	Gln	Pro	Trp	Glu	Gln	Asn	Ile	Leu	Asp	Lys	Ile	Arg	
				245					250					255		
aag	acg	ttc	tat	ctc	ccg	gct	tgg	tgc	tcc	acc	gat	gat	tat	gtc	aac	816
Lys	Thr	Phe	Tyr	Leu	Pro	Ala	Trp	Cys	Ser	Thr	Asp	Asp	Tyr	Val	Asn	
			260					265						270		

ttg ctt caa tcc cat tct ctc cag gat att aag tgt gcg gat tgg tca 864
 Leu Leu Gln Ser His Ser Leu Gln Asp Ile Lys Cys Ala Asp Trp Ser
 275 280 285
 gag aac gta gct cct ttc tgg cct gcg gtt ata cgg act gca tta aca 912
 Glu Asn Val Ala Pro Phe Trp Pro Ala Val Ile Arg Thr Ala Leu Thr
 290 295 300
 tgg aag ggc ctt gtg tct ctg ctt cgt agt ggt atg aaa agt att aaa 960
 Trp Lys Gly Leu Val Ser Leu Leu Arg Ser Gly Met Lys Ser Ile Lys
 305 310 315 320
 gga gca ttg aca atg cca ttg atg att gaa ggt tac aag aaa ggt gtc 1008
 Gly Ala Leu Thr Met Pro Leu Met Ile Glu Gly Tyr Lys Lys Gly Val
 325 330 335
 att aag ttt ggt atc atc act tgc cag aag cca ctc taa 1047
 Ile Lys Phe Gly Ile Ile Thr Cys Gln Lys Pro Leu
 340 345

<210> 24

<211> 348

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 24

Met Lys Ala Thr Leu Ala Ala Pro Ser Ser Leu Thr Ser Leu Pro Tyr
 1 5 10 15

Arg Thr Asn Ser Ser Phe Gly Ser Lys Ser Ser Leu Leu Phe Arg Ser
 20 25 30

Pro Ser Ser Ser Ser Ser Val Ser Met Thr Thr Thr Arg Gly Asn Val
 35 40 45

Ala Val Ala Ala Ala Ala Thr Ser Thr Glu Ala Leu Arg Lys Gly Ile
 50 55 60

Ala Glu Phe Tyr Asn Glu Thr Ser Gly Leu Trp Glu Glu Ile Trp Gly
 65 70 75 80

Asp His Met His His Gly Phe Cys Asp Pro Asp Ser Ser Val Gln Leu
 85 90 95

Ser Asp Ser Gly His Lys Glu Ala Gln Ile Arg Met Ile Glu Glu Ser
 100 105 110

Leu Arg Phe Ala Gly Val Thr Asp Glu Glu Glu Lys Lys Ile Lys

115	120	125
Lys Val Val Asp Val Gly Cys Gly Ile Gly Gly Ser Ser Arg Tyr Leu		
130	135	140
Ala Ser Lys Phe Gly Ala Glu Cys Ile Gly Ile Thr Leu Ser Pro Val		
145	150	155
Gln Ala Lys Arg Ala Asn Asp Leu Ala Ala Ala Gln Ser Leu Ala His		
165	170	175
Lys Ala Ser Phe Gln Val Ala Asp Ala Leu Asp Gln Pro Phe Glu Asp		
180	185	190
Gly Lys Phe Asp Ile Val Trp Ser Met Glu Ser Gly Glu His Met Pro		
195	200	205
Asp Lys Ala Lys Phe Val Lys Glu Leu Val Arg Val Ala Ala Pro Gly		
210	215	220
Gly Arg Ile Ile Ile Val Thr Trp Cys His Arg Asn Leu Ser Ala Gly		
225	230	235
Glu Glu Ala Leu Gln Pro Trp Glu Gln Asn Ile Leu Asp Lys Ile Arg		
245	250	255
Lys Thr Phe Tyr Leu Pro Ala Trp Cys Ser Thr Asp Asp Tyr Val Asn		
260	265	270
Leu Leu Gln Ser His Ser Leu Gln Asp Ile Lys Cys Ala Asp Trp Ser		
275	280	285
Glu Asn Val Ala Pro Phe Trp Pro Ala Val Ile Arg Thr Ala Leu Thr		
290	295	300
Trp Lys Gly Leu Val Ser Leu Leu Arg Ser Gly Met Lys Ser Ile Lys		
305	310	315
Gly Ala Leu Thr Met Pro Leu Met Ile Glu Gly Tyr Lys Lys Gly Val		
325	330	335
Ile Lys Phe Gly Ile Ile Thr Cys Gln Lys Pro Leu		
340	345	

<210> 25

<211> 580

<212> DNA

<213> Brassica napus

<220>

<221> misc_structure

<222> (1)..(580)

<400> 25

gtcgacgagc tcatggggcg aagggtcttg ctgcaccaag agattttctt gcaccaacgg 60
catggtttga ggaagggcta cggcctgact acactattgt tcagaagttt ggcggtgaac 120
tctttactgc taaacaagat ttctctccgt tcaatgtggt tgcctggcat ggcaattacg 180
tgccttataa gtatgacctg cacaagttct gtccatacaa cactgtcctt gtagaccatg 240
gagatccatc tgtaaataca gttctgacag caccaacgga taaacctggt gtggccttgc 300
ttgattttgt catattccct cctcgttggt tggttgctga gcatacctt cgacctcctt 360
actaccatcg taactgcatg agtgaattta tgggcctaata ctatggtgct tacgaggcca 420
aagctgatgg atttctacct ggtggcgcaa gtcttcacag ttgtatgaca cctcatggtc 480
cagatacaac cacatacgag gcgacgattg ctctgtgtaa tgcaatggct ccttataagc 540
tcacaggcac catggccttc atgtttgagg taccagtact 580

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<400> 26

gatatcatgg actcctacgt gattcagacg

30

<210> 27

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(29)

<400> 27

gatatcttat ttgtcacact cctcctggc

29

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz:Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<400> 28

gtcgacatgg caacccttaa gtgc

24

<210> 29

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<400> 29

gtcgacttac ttaacaccat tgacg

25

<210> 30

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<400> 30

gtcgacatgg cgagcaacgg agtt

24

<210> 31

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<400> 31

gtcgactcag ttgacagaga cgacg

25

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(30)

<400> 32

ggatccgatc catgagcgaa gaacaaccac

30

<210> 33

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<400> 33
ggatccttac atttcgagat tattatc

27

<210> 34
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1) .. (27)

<400> 34
agatctatgg agaattggagc aacgacg

27

<210> 35
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1) .. (31)

<400> 35
agatctatat gggttgatat tgagtcttgg c

31

<210> 36
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1) .. (26)

<400> 36
gcccgggcat ggcttccatt gctctc

26

<210> 37
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)

<400> 37
gcccgggcgc tcaaattatg aagtta

26

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(24)

<400> 38
ggatccatgg gccaccaaaa cgcc

24

<210> 39
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)

<400> 39
gtcgactcat ccactaact gtttgg

26

<210> 40
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(26)

<400> 40
ggatccatgg agtctctgct ctctag

26

<210> 41
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(32)

<400> 41
ccatgggatcc tcacttcaaa aaaggtaaca gc

32

<210> 42
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>
<221> primer_bind
<222> (1)..(31)

<400> 42
gatatcacca tggccgctgg actgtatctc c

31

<210> 43
<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1) .. (30)

<400> 43

gtcgacctta agaatttaag cttgagtggc

30

<210> 44

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1) .. (27)

<400> 44

gatatcatgg aaatttccgc cccacag

27

<210> 45

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1) .. (28)

<400> 45

gatatccagt gttattccct cagaatgg

28

<210> 46

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<400> 46

ggatccatga aagcaactct agcagc

26

<210> 47

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<400> 47

gtcgacttag agtggcttct ggcaag

26

<210> 48

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<400> 48

gtcgacgagc tcatgggggc gaag

24

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(21)

<400> 49

agtactggta cctcaaacaat g

21

<210> 50

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(23)

<400> 50

tctagactag aatccaactt ctg

23

<210> 51

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<400> 51

tctagagctc gatcgagcgg ccgc

24

<210> 52

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Kntliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<400> 52

gcccgggcca aatttacaat tgccac

26

<210> 53

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(23)

<400> 53

gcccgggcta attcccgatc tag

23

<210> 54

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<400> 54

gcccgggcat ctgtcgtctc aaactc

26

<210> 55

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<400> 55

gcccgggctg ttgtcgcaaa attcgccc

28

<210> 56

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<400> 56

gcccgggcat ctgtcgtctc aaactc

26

<210> 57

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(23)

<400> 57

gcccgggcta attcccgatc tag

23

<210> 58

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Die Beschreibung von Knstliche Sequenz: Primer

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<400> 58

gcccgggcct agaattccaac ttctg

25